

**Untersuchungen zur Wirkung von 1,4-Dihydropyridinen
auf den Ca^{2+} -Kanal und die elektro-mechanische
Kopplung an Skelettmuskelfasern des Frosches**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum**

vorgelegt von

Roland Neuhaus

Bochum 1988



Untersuchungen zur Wirkung von 1,4-Dihydropyridinen
auf den Ca^{2+} -Kanal und die elektro-mechanische
Kopplung an Skelettmuskelfasern des Frosches

Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Untersuchungen zur Wirkung von 1,4-Dihydropyridinen
auf den Ca^{2+} -Kanal und die elektro-mechanische
Kopplung an Skelettmuskelfasern des Frosches**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Roland Neuhaus

Bochum 1988

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Methoden	15
2.1 Präparat	15
2.2 Zusammensetzung der Versuchslösungen	15
2.3 Versuchsaufbau	18
2.4 Versuchsablauf	19
2.5 Die lichtinduzierte Inaktivierung von Nifedipin	21
2.6 Auswertung der Stromaufzeichnungen	23
3. Ergebnisse	26
3.1 Die Potentialabhängigkeit des Ca^{2+} -Einstroms	26
3.2 Die Wirkungen von Nifedipin und BAY K8644 auf den Ca^{2+} -Einstrom	28
3.3 Der Einfluß von Nifedipin auf die Potentialschwelle zur Kontraktionsauslösung	33
3.4 Paralyseversuche mit Nifedipin	41
3.5 Die Wirkung von Nifedipin auf die Kraftentwicklung in nominell Ca^{2+} -freien Lösungen	43
3.6 Der Zusammenhang zwischen Ca^{2+} -Einstrom und Kraftentwicklung	52
3.7 Versuche mit Na^{+} - und Li^{+} -Lactatlösungen	57
4. Diskussion	66
4.1 Die Wirkung von Nifedipin auf den Potentialsensor der elektro-mechanischen Kopplung	66
4.2 Die Rolle des Ca^{2+} -Einstroms bei der elektro-mechanischen Kopplung	75

4.3	Strom-induzierte Kontraktionen in Na ⁺ - und Li ⁺ - Lactatlösungen	77
4.4	Schlußfolgerung und Ausblick	79
5.	Zusammenfassung	84
6.	Literaturverzeichnis	87

1. EINLEITUNG

Die Kontraktion einer Skelettmuskelfaser wird über eine Depolarisation ihrer Oberflächenmembran ausgelöst. Dies geschieht unter natürlichen Bedingungen durch ein regeneratives Aktionspotential, das sich über die Muskelfasermembran ausbreitet. Die Erregung gelangt über transversale Tubuli (Einstülpungen der Membran) ins Faserinnere und wird dort über einen noch nicht aufgeklärten Vorgang auf das sarkoplasmatische Retikulum (SR), den intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, übertragen. Es kommt zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus den Terminalzisternen des SR und dadurch zu einem Anstieg der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration. Über die Bindung von Ca^{2+} an Troponin C führt dies zu einer Aufhebung des Sperrmechanismus am Aktinfilament und somit zur Einleitung des Querbrückenzyklus. Nach Beendigung der Ca^{2+} -Freisetzung bewirkt ein aktiver Rücktransport dieser Ionen in das SR, daß die Ca^{2+} -Konzentration im Myoplasma wieder auf ihren Ruhewert absinkt; die Muskelfaser erschlafft. Die Prozesse beginnend mit der Depolarisation der Muskelfaser bis hin zur Kontraktion werden unter dem Begriff der elektro-mechanischen Kopplung zusammengefaßt. Detailliert beschrieben wurden diese Vorgänge u.a. von HUXLEY (1974), LÜTTGAU und GLITSCH (1976), LÜTTGAU und STEPHENSON (1986) sowie CAILLÉ, ILDEFONSE und ROUGIER (1985).

Im Gegensatz zum Herzmuskel der Wirbeltiere, bei dem das zur Aktivierung des Querbrückenzyklus notwendige Ca^{2+} größtenteils von außen über Membrankanäle in die Zelle gelangt, ist der Skelettmuskel für seine Kontraktilität nicht unmittelbar auf extrazelluläres Ca^{2+} angewiesen. Von verschiedenen Autoren wurde gezeigt, daß am Skelettmuskel selbst dann noch Einzelzuckungen und Kontraktionen ausgelöst werden können, wenn der Gehalt an Ca-Ionen in der extrazellulären Lösung

durch Einsatz des Ca^{2+} -Chelators EGTA (Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure) auf extrem niedrige Werte reduziert wird. Unter diesen Bedingungen findet eine Umkehr des elektrochemischen Ca^{2+} -Gradienten an der Faser-membran statt (ARMSTRONG, BEZANILLA & HOROWICZ, 1972; LÜTTGAU & SPIECKER, 1979). Gleichwohl besitzt der Skelett-muskel wie der Herzmuskel potentialabhängige Ca^{2+} -Kanäle in seiner Oberflächenmembran, durch die bei Depolarisation Ca -Ionen aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmen (BIANCHI & SHANES, 1959; BEATY & STEFANI, 1976; STANFIELD, 1977).

Erst in den letzten Jahren entdeckte man, daß es mehr als nur einen Ca^{2+} -Kanaltyp in den Oberflächenmembranen von Muskelzellen gibt. Neben dem "klassischen" Ca^{2+} -Kanal, der wegen seiner Kinetik als L-Typ (long lasting) bezeichnet wurde, fand man einen zweiten Ca^{2+} -Kanal, der sich sowohl in seiner Potential- und Zeitabhängigkeit als auch in der pharmakologischen Beeinflußbarkeit von dem L-Typ unterscheidet (BEAN, 1985; NILIUS, HESS, LANSMANN & TSIEN, 1985; COGNARD, LAZDUNSKI & ROMÉY, 1986; COTA & STEFANI, 1986). Der neu-entdeckte Ca^{2+} -Kanal erhielt aufgrund seiner vergleichsweise schnellen Kinetik die Bezeichnung T-Typ (transient). In Tabelle 1 sind einige der wichtigsten funktionellen Unterschiede der beiden Kanaltypen aufgelistet. Eine eventuelle Beteiligung des T-Typ Ca^{2+} -Kanals bei der elektro-mechanischen Kopplung ist umstritten. Am Herzmuskel spielt er möglicherweise eine Rolle als Schrittmacher und bei der Auslösung von Aktionspotentialen (NILIUS et al., 1985). Kürzlich wurde an Hühner-Neuronen ein weiterer Ca^{2+} -Kanaltyp (N-Typ) gefunden, dessen Einzelkanalleitfähigkeit mit 13 pS zwischen der von L- und T-Typ liegt (FOX, NOWYCKY & TSIEN, 1987). Die Expression des N-Typ Kanals scheint auf Membranen neuronaler Strukturen beschränkt zu sein. Die selektive Blockierung des Kanals mit neuronal wirksamen Pharmaka wie

Tab. 1 Funktionelle Unterschiede zwischen L- und T-Typ Ca^{2+} -Kanal

	L-Typ	T-Typ	
Einzelkanalleitfähigkeit	18 - 25 pS	8 pS	(1)
Schwellenpotential der Aktivierung	-30 mV	-65 mV -60 mV	(2) (4)
max. Stromamplitude bei	-10 mV	-30 mV	(2)
Zeit bis zum Maximum (time to peak)	70 ms (-2 mV) 10-12 ms (0 mV)	16 ms (-30 mV) 25 ms (-11 mV)	(2) (4) (5)
Potential der halbmax. Inaktivierung ($V_{ho.s}$)	-33 bzw. -44 mV	-78 mV	(6,2)
pharmakologische Beeinflußbarkeit	DHP*-sensitiv	DHP*-insensitiv	(1,2)
Aktivität in "inside-out patches"	Aktivitätsverlust nach 1 min	anhaltende Aktivität	(1)
Leitfähigkeiten (G) für Ca, Ba	G(Ba) > G(Ca)	G(Ba) = G(Ca)	(2,3)

Quellen: (1) - NILIUS et al., 1985 (Herzmuskel)
 (2) - COGNARD et al., 1986 ("myoballs" der Ratte, T=20 °C)
 (3) - BEAN, 1985 (Kaninchenvorhof)
 (4) - COTA & STEFANI, 1986 (Frosch-Skelettmuskel, T=18 °C)
 (5) - ISENBERG & KLOCKNER, 1980 (Herzmuskel, T=37 °C)
 (6) - COTA, NICOLA SIRI & STEFANI, 1984 (Werte vom Skelettmuskel von R. pipiens bzw. moctezuma, T=23 °C)

DHP*: 1,4-Dihydropyridine

Dynorphin, Adenosin und Adrenalin weist auf eine mögliche Beteiligung dieses Kanaltyps an der Transmitterfreisetzung hin (FOX et al., 1987). In der vorliegenden Arbeit soll von den Ca^{2+} -Kanälen nur der L-Typ eingehender betrachtet werden, der im folgenden meist einfach als " Ca^{2+} -Kanal" aufgeführt wird. Der Kanal ist unter physiologischen Bedingungen hoch selektiv für Ca^{2+} -Ionen. Dieses Verhalten beruht allerdings nicht auf einer intrinsischen Eigenschaft des Kanals, da in Ca^{2+} -gepufferten Lösungen mit submikromolaren Ca^{2+} -Konzentrationen ein Selektivitätsverlust eintritt. Der Kanal erweist sich unter dieser Bedingung auch für andere di- und monovalente Kationen als permeabel (Ba, Sr, Mn, Mg, Li, Na, K, Rb, Cs; ALMERS, McCLESKEY & PALADE, 1985). ALMERS und Mitarbeiter erklärten die Ca^{2+} -abhängige Ca^{2+} -Selektivität auf der Basis einer von EISENMAN (1962) entwickelten Theorie zur Interpretation der Eigenschaften von ionensensitiven Gläsern. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde von den Autoren als "Selektivität durch Affinität" (selectivity by affinity) bezeichnet. Hierbei werden Rezeptoren im Innern des Kanals postuliert, die von allen Ionensorten Ca^{2+} mit höchster Affinität binden. Der scheinbare Widerspruch zwischen hoher Bindungsstärke und großer Durchlaßrate wurde von den Autoren durch ein Modell gelöst, das wenigstens zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen im Innern der Pore vorsieht. Die Bindungsstellen können simultan oder nacheinander besetzt werden. Eine Abdissoziation des Calciums von diesen Bindungsstellen und ein Durchtritt durch den Kanal ist nur bei Doppelbesetzung aufgrund der gegenseitigen elektrostatischen Abstoßung der beiden Ca-Ionen möglich. In Abwesenheit von Ca^{2+} können so auch andere Kationen den Kanal passieren. Auf der Grundlage dieses Modells erklärt sich auch die relativ geringe Leitfähigkeit für Ca^{2+} im Vergleich zu der von einigen anderen Ionen, die wegen ihrer niedrigeren Affinität zu den Kanalbindungsstellen leichter permeieren können. Ein weiteres Charakteristikum des L-Typ Ca^{2+} -Kanals stellt die

relativ langsame spontane Inaktivierung des Ca^{2+} -Stromes dar, die nur bei längeren Depolarisationen beobachtet werden kann. Für den zugrunde liegenden Mechanismus existieren mehrere Hypothesen. Im Unterschied zum Na^+ -Kanal, der lediglich zeit- und potentialabhängig inaktiviert, scheint bei dem Inaktivierungsprozeß am Ca^{2+} -Kanal der Ca^{2+} -Einstrom selbst einen Einfluß zu nehmen. Es wird vermutet, daß zumindest bei einigen Präparaten (Ganglienzellen von *Aplysia*, *Paramecium*) die Akkumulation von Ca^{2+} an der Membraninnenseite die Inaktivierung des Kanals auslöst (BREHM & ECKERT, 1978; TILLOTSON, 1979). Für den Skelettmuskel wurde von ALMERS, FINK und PALADE (1981) ein anderer Mechanismus vorgeschlagen. Sie führen die Inaktivierung des Ca^{2+} -Einstroms auf eine Verarmung an Ca-Ionen im Lumen der T-Tubuli zurück. COTA, NICOLA SIRI und STEFANI (1984) fanden hingegen am Froschskelettmuskel eine Potentialabhängigkeit der Inaktivierung des Ca^{2+} -Kanals, die zudem unabhängig von der Amplitude des Ca^{2+} -Einstroms war. Die unterschiedlichen Befunde der beiden Gruppen sind wahrscheinlich z.T. durch verschiedene methodische Ansätze bedingt. COTA und Mitarbeiter (1984) führten ihre Versuche unter Verwendung hypertoner Badlösungen durch. Nach Angaben der Autoren ergibt sich hierbei im Unterschied zu den von ALMERS und Mitarbeitern (1981) in isotonen Lösungen untersuchten "cut fibre"-Präparaten ein vergrößertes T-tubuläres Volumen und somit eine geringere Wahrscheinlichkeit einer Ca^{2+} -Verarmung im T-System. Als weitere Ursache dafür, daß bei ihren Experimenten keine auf Ca^{2+} -Mangel beruhende Effekte auftraten, wurde von COTA und Mitarbeitern (1984) die Existenz aktiver Transportmechanismen in der T-tubulären Membran angeführt. Diese Ca^{2+} -Pumpen, die unter physiologischen Bedingungen einer Ca^{2+} -Verarmung im T-System entgegenwirken, wurden in den Präparationen von ALMERS und Mitarbeitern (1981) wahrscheinlich durch die hohe intrazelluläre EGTA-Konzentration gehemmt. Neuere Untersuchungen an Helix-Neuronen geben Hin-



weise auf einen weiteren Inaktivierungsmechanismus, bei dem eine Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Phosphatase beteiligt ist (CHAD & ECKERT, 1986).

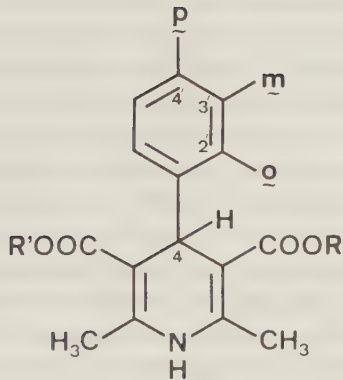
Ob und inwieweit der Ca^{2+} -Einstrom durch den L-Typ Kanal am Skelettmuskel für die Kraftentwicklung eine Rolle spielt, ist gegenwärtig noch unklar und wird kontrovers diskutiert. Einigkeit herrscht weitgehend darüber, daß der Ca^{2+} -Strom nicht direkt an der Auslösung der Kontraktion beteiligt ist. Die sehr langsame Aktivierungskinetik des L-Typ Kanals hat vermutlich zur Folge, daß bei einer durch ein Aktionspotential ausgelösten Einzelzuckung gar kein Einstrom durch den Kanal erfolgt (SANCHEZ & STEFANI, 1978). Untersuchungen auf diesem Gebiet beschränken sich daher auf Kontraktorexperimente mit Depolarisationen von mehreren Sekunden Dauer.

Für die Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung des L-Typ Ca^{2+} -Kanals ist insbesondere seine leichte pharmakologische Beeinflußbarkeit von Nutzen. Hier stehen eine Vielzahl von Substanzen zur Verfügung, die eine modulierende Wirkung auf den Ca^{2+} -Kanal ausüben und als Ca^{2+} -Antagonisten bzw. Ca^{2+} -Agonisten bezeichnet werden. Oft werden für Ca^{2+} -Antagonisten auch die Begriffe Ca^{2+} -Kanalblocker oder Ca^{2+} -Einstromblocker genannt, um deren hemmende Wirkung auf den Ca^{2+} -Kanal hervorzuheben. GODFRAIND, MILLER und WIBO (1986) schlagen eine Neudefinition des Begriffs " Ca^{2+} -Antagonist" vor, die weitaus umfassender ist. Hiernach handelt es sich ganz allgemein um Stoffe, welche die Ca^{2+} -Funktion auf zellulärer Ebene beeinflussen, indem sie den Ca^{2+} -Einstrom, die Ca^{2+} -Freisetzung oder eine intrazelluläre Ca^{2+} -Funktion hemmen. Meist werden jedoch die Bezeichnungen Ca^{2+} -Antagonist und Ca^{2+} -Kanalblocker synonym verwendet. Eine Übersicht der verschiedenen Ca^{2+} -Modulatoren und ihre Klassifizierung wurde von GODFRAIND und Mitarbeitern (1986) verfaßt.

Die Blocker für den L-Typ Kanal unterteilt man aufgrund ihrer chemischen Struktur in drei verschiedene Klassen: Die Phenylalkylamine (z.B. Verapamil, Gallopamil (D 600)), die Benzothiazepine (Diltiazem) und die Dihydropyridine (Nifedipin, Nimodipin, Nitrendipin, etc.). Unter den Dihydropyridinen finden sich auch Substanzen, die zu den Ca^{2+} -Agonisten gerechnet werden, da sie den Ca^{2+} -Einstrom fördern (z.B. BAY K8644). Indessen ist die strikte Trennung der Ca^{2+} -Modulatoren in Antagonisten und Agonisten bezüglich der Wirkung auf den Ca^{2+} -Einstrom nicht unproblematisch. Bei einigen Dihydropyridinen hängt die Qualität der Wirkung von den experimentellen Bedingungen, wie der eingesetzten Konzentration und dem Membranpotential, ab (REUTER, PORZIG, KOKUBUN & PROD'HOM, 1986). Auch die Tatsache, daß die beiden Enantiomere mancher chiraler Dihydropyridine entgegengesetzte Wirkungen zeigen, weist darauf hin, daß beiden Effekten ein sehr ähnlicher molekularer Wirkungsmechanismus zugrunde liegt. BECHEM und SCHRAMM (1987) entwickelten hierfür ein Modell, das die antagonistische und die agonistische Wirkung auf einen gemeinsamen (agonistischen) Mechanismus zurückführt. Hiernach bindet der Ca^{2+} -Modulator nur an den Offenzustand des Ca^{2+} -Kanals und verhindert dadurch für die Dauer der Assoziation die Schließung des Kanals. Daraus resultiert eine konzentrationsabhängige Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit in Richtung negativerer Membranpotentiale und gleichzeitig eine erhöhte Wahrscheinlichkeit des Übergangs in den inaktivierten Zustand. Letztlich ist nach Auffassung der Autoren die Qualität der Wirkung eines Ca^{2+} -Modulators (agonistisch oder antagonistisch) von der Geschwindigkeitskonstante seiner Assoziation bzw. Dissoziation am Rezeptor abhängig. HESS, LANSMANN und TSIEN (1984) beobachteten mit Nitrendipin, einer als Ca^{2+} -Antagonist deklarierten Substanz, ebenfalls eine agonistische Komponente. Sie entwickelten zur Interpretation der Dihydropyridinwirkung auf den Ca^{2+} -Strom ein Kanalmodell, das drei verschie-

dene Schaltverhalten (gating modes) vorsieht. "Mode 0" ist gekennzeichnet durch fehlende Kanalaktivität während einer Stromaufzeichnung. In "mode 1" werden Stromspuren mit kurzen Kanalöffnungen zusammengefaßt, und "mode 2" beschreibt sehr lange Kanalöffnungen mit nur kurzen Schließungen. Nach den Vorstellungen der Autoren erzeugen die Dihydropyridine keine "neuen" Kanalzustände, sondern bewirken eine Verschiebung in der Häufigkeitsverteilung der möglichen Schaltverhalten des Ca^{2+} -Kanals in die eine (mode 0 - Antagonisten) oder andere (mode 2 - Agonisten) Richtung.

In den folgenden Ausführungen über Struktur, Rezeptoren und Wirkungsmechanismen der Ca^{2+} -Antagonisten möchte ich mich auf die Gruppe der Dihydropyridine beschränken und insbesondere das Nifedipin hervorheben, das in den eigenen Experimenten eingesetzt wurde. Nifedipin ist einer der bekanntesten Vertreter der Dihydropyridine. Unter dem Handelsnamen Adalat® findet es in der Medizin als Koronardilatator bei der Therapie koronarer Herzerkrankungen Anwendung. Die molekulare Struktur von Nifedipin und einigen verwandten Dihydropyridinen ist in Abb.1 dargestellt. Charakteristisch und notwendig für die negativ inotrope Wirkung am isolierten Herzmuskel ist die Dihydropyridinstruktur mit dem sekundären Stickstoffatom und der Benzolring in Position 4 des Heterozyklus. Die Nitrogruppe am Benzolring des Nifedipins ist für dessen Lichtsensibilität verantwortlich. Diese Eigenschaft erwies sich im Experiment durchaus von Vorteil, da sie es ermöglichte, den Ca^{2+} -Kanalblocker gezielt durch Lichtexposition zu inaktivieren (s.Kap.2.6). Dihydropyridine sind bei physiologischen pH-Werten ungeladen und können sich in biologischen Membranen um ein Vielfaches der eingesetzten Konzentration der Badlösung anreichern (HERBETTE, CHESTER & RHODES, 1986). Mit Hilfe radioaktiver Liganden war es möglich, Untersuchungen über den Wirkort, d.h. über die Rezeptoren der Dihydropyridine durchzuführen. Erste Experimente



Nifedipin: $R = R' = \text{CH}_3$; $2' = \text{NO}_2$

Nimodipin: $R = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$; $R' = \text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2$; $3' = \text{NO}_2$

Niludipin: $R = R' = \text{C}_3\text{H}_7\text{OCH}_2\text{CH}_2$; $3' = \text{NO}_2$

Abb. 1 Die molekulare Grundstruktur der 1,4-Dihydropyridine
Notwendige Strukturen für die antagonistische Wirkung: DHP-Struktur
mit sekundärem Stickstoffatom, Benzolring in Position 4 des Hetero-
zyklus (verändert nach FLAIM & ZELIS, 1982).

auf diesem Gebiet wurden mit ^3H -Nitrendipin vorgenommen (BELLEMANN, FERRY, LÜBBECKE & GLOSSMANN, 1981). Inzwischen wurde eine Vielzahl radioaktiv markierter Dihydropyridine hergestellt, mit denen Bindungs- und Affinitätsstudien betrieben werden. In allen bereits untersuchten Geweben wurde bis auf wenige Ausnahmen nur eine einzige Klasse von Rezeptoren mit hoher Affinität für Dihydropyridine gefunden. Die ermittelten Werte für die Dissoziationskonstante des Dihydropyridin-Rezeptorkomplexes schwanken je nach Präparat. Beim Skelettmuskel wurden K_D -Werte zwischen 1 und 5 nM ermittelt (GODFRAIND, MILLER & WIBO; 1986). In elektrophysiologischen Experimenten waren zur halbmaximalen Blockierung der Ca^{2+} -Ströme am Skelettmuskel Nifedipin-Konzentrationen zwischen 0,2 und 0,9 μM erforderlich (ALMERS & McCLESKEY, 1984; ILDEFONSE, JACQUEMOND, ROUGIER, RENAUD, FOSSET & LAZDUNSKI, 1985). Die höchste Rezeptordichte weist das T-System des Skelettmuskels auf (50 pmol/kg Protein; FOSSET, JAIMOVICH, DELPONT & LAZDUNSKI, 1983). Sie ist hier um eine Größenordnung höher als bei allen anderen bisher untersuchten Präparaten. Die hohe Spezifität der Bindungsstelle zeigt sich in ihrer Stereoselektivität. Die (+) und (-) Enantiomere der gleichen Verbindung differieren z.T. sehr stark in ihrer Affinität zum Dihydropyridin (DHP)-Rezeptor (z.B. im Verhältnis 1:600 für BAY E6927; SARMIENTO, JANIS, KATZ & TRIGGLE, 1984). Über die molekulare Struktur und die chemischen und physikalischen Eigenschaften des DHP-Rezeptors liegen mittlerweile eine Reihe von Untersuchungen vor, die je nach Methode und verwendetem Präparat zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem Rezeptormolekül um ein Glykoprotein, das aus mehreren (3-4) Polypeptidketten aufgebaut ist. Photoaffinitätsmarkierungen ergaben, daß hierbei die Rezeptoreigenschaft Bestandteil eines 170 kD Polypeptids ist. Erst kürzlich gelang es einer Forschergruppe, die Primärstruktur dieses Polypeptids durch DNA-Sequenzierung aufzuklären (TANABE, T.,

TAKESHIMA, H., MIKAMI, A., FLOCKERZI, V., TAKAHASHI, H., KANGAWA, K., KOJIMA, M., MATSUO, H., HIROSE, T. & NUMA, S., 1987). Sie fanden dabei eine weitgehende Homologie zu dem potentialabhängigen Na^+ -Kanal, sowohl hinsichtlich der Aminosäuresequenz als auch der abzuleitenden transmembranalen Topologie des Peptids. Beiden gemeinsam ist die Ausbildung von vier homologen Einheiten, sogenannten "repeats", die aus jeweils sechs α -helikalen Segmenten bestehen. Diese Befunde und die Konzentrierung der DHP-Rezeptoren wie auch der Ca^{2+} -Kanäle im T-System des Skelettmuskels legen den Schluß nahe, daß es sich bei dem DHP-Rezeptor um den Ca^{2+} -Kanal handelt. Für die Identität beider Strukturen sprechen auch die Versuchsergebnisse einiger Forschergruppen, die bei Rekonstitutionsexperimenten mit aufgereinigten DHP-Rezeptoren in Phospholipidbilayern bzw. -vesikeln funktionelle Ca^{2+} -Kanäle erhielten (FLOCKERZI, OEKEN, HOFMANN, PELZER, CAVALIE & TRAUTWEIN, 1986; CURTIS & CATTERALL, 1986). TANABE und Mitarbeiter (1987) fanden die für eine Kanalausbildung typischen Komponenten in der Aminosäuresequenz des DHP-Rezeptors wieder. Die innere Wandung der Kanalöffnung mit einem Durchmesser von etwa 0,6 nm könnte ihrer Vorstellung nach aus jeweils ein oder zwei Helices der "repeats" gebildet werden. Auch für die bereits erwähnten Ca^{2+} -Bindungsstellen im Innern des Kanals wurden Anhaltspunkte in der DHP-Rezeptorstruktur entdeckt.

Auf der anderen Seite berichteten einige Autoren über Experimente, deren Ausgang der Vorstellung von der Identität von DHP-Rezeptor und Ca^{2+} -Kanal scheinbar widerspricht. So wurden in "voltage clamp"-Studien stets 100-1000 fach höhere Dihydropyridin-Konzentrationen zur Blockierung des Ca^{2+} -Einstroms benötigt, als es von Bindungsstudien her zu erwarten gewesen wäre (LEE & TSIEN, 1983; KASS, 1982). BEAN (1984) wies jedoch in seinen Untersuchungen mit Nitrendipin darauf hin, daß die Bindung von Dihydropyridinen an ihre Rezeptoren

in Abhängigkeit vom Kanalzustand (d.h. letztlich vom Membranpotential) erfolgt. Aus diesem Grund sind Bindungsdaten, die an Membranfragmenten gewonnen wurden, nicht ohne weiteres mit Versuchsergebnissen an ganzen Zellen vergleichbar. SCHWARTZ, McCLESKEY und ALMERS (1985) führten hingegen an intakten Skelettmuskelfasern Bindungsstudien mit dem Ca^{2+} -Antagonisten ^3H -PN 200-110 durch. Ein Vergleich der Anzahl an DHP-Bindungsstellen mit der Anzahl der Ca^{2+} -Kanäle ergab, daß etwa 35-50 mal mehr DHP-Rezeptoren als funktionelle Ca^{2+} -Kanäle vorliegen müssen. Die Kalkulation, die diesen Zahlen zugrunde liegt, wurde jedoch von LAMB und WALSH (1987) in Frage gestellt. SCHWARTZ und Mitarbeiter (1985) verglichen die maximalen Ca^{2+} -Ströme intakter Muskelfasern mit der Größe von Einzelkanalströmen aus anderen Untersuchungen und berechneten daraus die Anzahl der Ca^{2+} -Kanäle. Die Kritik richtet sich hierbei gegen die Annahme, jeder Ca^{2+} -Kanal sei während des maximalen Stromes kontinuierlich geöffnet. LAMB und WALSH (1987) führen dagegen Untersuchungen an reincorporierten Ca^{2+} -Kanälen in künstlichen Membranen an, bei denen durchschnittliche Offenzeitanteile bei einem Potential nahe 0 mV von nur 0,08 (CORONADO & AFFOLTER, 1986) bzw. 0,05 bis 0,25 (FLOCKERZI et al., 1986) festgestellt wurden. Unter der Annahme eines Offenzeitanteils von 0,08 und bei einem Einzelkanalstrom von 0,07 pA kamen LAMB und WALSH (1987) in eigenen Berechnungen auf 1-2 DHP-Bindungsstellen pro Ca^{2+} -Kanal. Sie verweisen jedoch darauf, daß die aus den oben genannten Experimenten gewonnenen Daten nicht ohne weiteres mit denen an intakten Fasern vergleichbar sind und daß es gegenwärtig nicht möglich ist, eine verlässliche Angabe über die Anzahl aktivierbarer Ca^{2+} -Kanäle im Skelettmuskel zu machen. Eine andere Hypothese für die physiologische Bedeutung des DHP-Rezeptors wurde von RIOS und BRUM (1987) aufgestellt. Sie untersuchten die Wirkung von Dihydropyridinen auf die "charge movements" und die Ca^{2+} -Freisetzung. Einer Theorie von SCHNEIDER und CHANDLER (1973)

zufolge wird am Skelettmuskel die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR durch spannungssensible Strukturen (Potentialsensoren) in der transversalen tubulären Membran gesteuert. Bei Änderung des Membranpotentials treten intramembranale Ladungsbewegungen (charge movements) auf, die als nichtlineare kapazitive Komponente des Membranstroms gemessen werden können und dem Potentialsensor zugeschrieben werden. RIOS und BRUM (1987) stellten fest, daß Nifedipin sowohl die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR vermindert als auch die intramembranaln Ladungsbewegungen in der Membran des T-Systems beeinflusst. Sie postulieren, daß der DHP-Rezeptor den Potentialsensor für die elektro-mechanische Kopplung darstellt. Die Primärstruktur des Rezeptors läßt vier solcher Potentialsensorsegmente zu (TANABE et al., 1987). In Anbetracht der strukturellen Befunde und der physiologischen Untersuchungsergebnisse wäre es auch denkbar, daß der DHP-Rezeptor beide Eigenschaften (Kanal und Potentialsensor für die elektro-mechanische Kopplung) in sich vereinigt, vorrangig aber als Potentialsensor fungiert. TANABE und Mitarbeiter (1987) führen für diese Hypothese Experimente an Mäusen mit muskulärer Dysgenese an, bei denen ein Verlust der Ca^{2+} -Permeabilität und der Kontraktilität immer mit einer Abnahme der DHP-Bindungsstellen gekoppelt war (POWELL & FAMBROUGH, 1973).

Die Frage nach der Funktion des DHP-Rezeptors stand auch im Vordergrund bei den Versuchen zur vorliegenden Arbeit. Hierzu wurde an Hand von "voltage clamp"-Experimenten untersucht, inwieweit und unter welchen experimentellen Bedingungen Nifedipin als ein Vertreter der DHP-Gruppe die Kraftentwicklung am Skelettmuskel beeinflusst. Zudem sollte ein Vergleich der Wirkungen des Ca^{2+} -Antagonisten auf die Kontraktion und auf den Ca^{2+} -Einstrom Aufschlüsse über eine eventuelle Identität von Ca^{2+} -Kanal und Potentialsensor der elektro-mechanischen Kopplung liefern. Eine weitere Ver-

suchsreihe beschäftigte sich mit der Rolle des Ca^{2+} -Einstroms während der Depolarisation. In diesem Zusammenhang wurde die Wirkung eines Ca^{2+} -Agonisten (BAY K8644) auf die Kraftentwicklung und auf den Ca^{2+} -Strom getestet. Es wurden außerdem Versuche in Ca^{2+} -„freien“ Lösungen vorgenommen, bei denen Na^+ sowie Li^+ als Ladungsträger für den Einstrom durch den Ca^{2+} -Kanal dienten. Die hierbei parallel zum Einstrom aufgetretenen Kontraktionen wurden unter Verwendung von Nifedipin als Kanalblocker untersucht.

Einige der in dieser Arbeit dargestellten Versuchsergebnisse wurden bereits veröffentlicht (NEUHAUS, 1986; BOEHLE, GOTTSCHALK, NEUHAUS & LÖTTGAU, 1987).

2. METHODEN

2.1 Präparat

Die Experimente zu dieser Arbeit wurden am *Musculus lumbricalis longissimus digiti IV* (ECKER, 1896) der Hinterbeine des braunen Grasfrosches (*Rana temporaria* L.) durchgeführt. Dieser pinnate Zehenmuskel besitzt vorwiegend kurze Zuckungsfasern mit einer durchschnittlichen Länge von 1,3 mm und einem Durchmesser von etwa 50 μm . Durch die Verwendung spezieller Badlösungen, die den Membranwiderstand heraufsetzten, konnte an diesen Muskelfasern auch mit der Punkt-"voltage clamp"-Methode eine uniforme Potentialverteilung über der gesamten Faserlänge erreicht werden (FELDMAYER, 1984). Die Präparation wurde in gekühlter Ringer-Lösung (Lsg. A) vorgenommen. Nicht sofort verwendete Muskeln wurden für spätere Versuche des gleichen Tages in Ringer-Lösung bei etwa 10 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Der herauspräparierte Muskel wurde an den Sehnenenden auf einem Silikonharzblöckchen (Sylgard 184, Dow Corning) mit Minutiennadeln fixiert und anschließend an einer Sehne der Länge nach aufgeschnitten. Nach dem Aufklappen der beiden Muskelhälften wurden diese an den Rändern der Sehne festgesteckt und die beim Einschnitt verletzten Fasern durch vorsichtiges Abzupfen mit der Pinzette entfernt. Das fertige Präparat wurde zusammen mit dem Blöckchen in die Versuchskammer überführt.

2.2 Zusammensetzung der Versuchslösungen

Für die Versuche wurden folgende Lösungen verwendet (alle Angaben in mMol/l):

Lösung A - Standard-Ringer-Lösung (ADRIAN, 1956)

NaCl: 115; KCl: 2,5; Na₂HPO₄: 2,15; NaH₂PO₄:
0,85; CaCl₂: 1,8.

Lösung B - Sulfat-Ringer-Lösung (HODGKIN & HOROWICZ, 1959)

Na₂SO₄: 38,75; K₂SO₄: 1,25; Na₂HPO₄: 1,08;
NaH₂PO₄: 0,43; CaSO₄: 9,4; Saccharose: 113; ^oTTX:
3,12·10⁻⁴.

Lösung C - Sulfat-Ringer-Lösung mit Mg²⁺ als Ca²⁺-Ersatz

Na₂SO₄: 38,75; K₂SO₄: 1,25; Na₂HPO₄: 1,08;
NaH₂PO₄: 0,43; MgSO₄: 17,4; Saccharose: 101;
^oTTX: 3,12·10⁻⁴.

Lösung D - Sulfat-Ringer-Lösung ohne divalente Kationen

Na₂SO₄: 38,75; K₂SO₄: 1,25; Na₂HPO₄: 1,08;
NaH₂PO₄: 0,43; Saccharose: 129; ^oTTX: 3,12·10⁻⁴

Lösung E - Tetraethylammonium-(TEA-) Lösung (NICOLA SIRI,
SANCHEZ & STEFANI, 1980)

(TEA)₂SO₄: 40; K₂SO₄: 1,25; *MOPS: 5; CaSO₄: 9,4;
Saccharose: 113; ^oTTX: 3,12·10⁻⁴.

Lösung F - TEA-Lösung mit Mg²⁺ als Ca²⁺-Ersatz

(TEA)₂SO₄: 40; K₂SO₄: 1,25; *MOPS: 5; MgSO₄:
17,4; Saccharose: 101; ^oTTX: 3,12·10⁻⁴.

Lösung G - HEPES-Ringer-Lösung (POTREAU & RAYMOND, 1982)

NaCl: 115; KCl: 2,5; ●HEPES: 10; CaCl₂: 1,8.

Lösung H - Na-Lactatlösung (POTREAU & RAYMOND, 1982)

Na-Lactat: 115; KHEPES: 2,5; ●HEPES: 10; ▽EGTA:
0,5; Glucose: 5,6; ^oTTX: 3,12·10⁻⁴.

Lösung I - Li-Lactatlösung (POTREAU & RAYMOND, 1982)

Li-Lactat: 115; KHEPES: 2,5; ●HEPES: 10; ▽EGTA:
0,5; Glucose: 5,6; °TTX: $3,12 \cdot 10^{-4}$.

°TTX: Tetrodotoxin (Na⁺-Kanal-Blocker)
*MOPS: 3-Morpholino-propansulfonsäure
●HEPES: N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethan-
sulfonsäure
▽EGTA: Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-
N,N'-tetraessigsäure.

Die Lösungen A - F wurden auf pH 7,0 eingestellt. Der pH-Wert der Lösungen G - I betrug 7,8. Die Lösungen B - F wurden als doppelt konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Saccharose bzw. Glucose und TTX wurden erst unmittelbar vor Versuchsbeginn zugegeben. Die freie Ca²⁺-Konzentration in den Lösungen B und E wurde mit einer Ca²⁺-Elektrode auf $\approx 4,0$ mM bestimmt (FELDMEYER, 1987). Die nominell Ca²⁺-freien Lösungen C, D und F enthielten durch Verunreinigungen ebenfalls Spuren von Ca²⁺. Die Konzentration an freiem Ca²⁺ in den Lactatlösungen (H und I) war durch Zugabe von 0,5 mM EGTA (Ca²⁺-Chelator) herabgesetzt. Bei der Annahme einer Ca²⁺-Verunreinigung dieser Lösungen von 10^{-5} M würde sich die Konzentration an nicht gebundenem Ca²⁺ hierbei auf $1,1 \cdot 10^{-10}$ M berechnen (zur Ermittlung der apparenten Bindungskonstante für den CaEGTA-Komplex siehe SPIECKER, 1977). Die verwendeten 1,4-Dihydropyridinderivate Nifedipin und BAY K8644 wurden aus 2 mM Stammlösungen mit DMSO (Dimethylsulf-oxid) als Lösungsmittel zugesetzt. Die Einwaage der beiden lichtempfindlichen Substanzen und das Ansetzen der Stammlösungen erfolgte unter gelber Dunkelkammerbeleuchtung. Die Stammlösungen wurden lichtgeschützt aufbewahrt. Nifedipin und BAY K8644 wurden in den Versuchslösungen in Konzentra-

tionen von 1-4 μM eingesetzt. Die DMSO-Konzentration dieser Lösungen betrug dementsprechend 0,05-0,2%. In Kontrollexperimenten mit 1% DMSO waren keine signifikanten Veränderungen der gemessenen Kontraktionen gegenüber denen in DMSO-freien Lösungen festzustellen (BERWE, 1985).

2.3 Versuchsaufbau

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurde ein Zwei-Elektroden-"voltage clamp"-Aufbau verwendet, der im wesentlichen der von GOTTSCHALK (1979 und 1984) beschriebenen Anlage entsprach. Zur intrazellulären Ableitung der Membranpotentiale und für die Strominjektion wurden Glasfibrilament-Mikroelektroden verwendet. Die Spannungselektroden waren mit einer 3 M KCl-Lösung gefüllt. Ihre elektrischen Widerstände lagen zwischen 8 und 12 M Ω . Die mit einer 2 M K-Citratlösung gefüllten Stromelektroden besaßen Widerstandswerte zwischen 6 und 10 M Ω . Die Elektroden wurden für alle Experimente mit Ausnahme der Schwellenmessungen flexibel gestaltet. Dadurch sollte eine Beschädigung der Muskelfasern an der Einstichstelle der Elektroden bei Kontraktionen verhindert werden. Die Herstellung flexibler Elektroden wurde von GOTTSCHALK (1979) ausführlich beschrieben. Zur Registrierung der isometrischen Kraftentwicklung wurde ein mechano-elektrischer Wandler (AME, Modell AE 875) eingesetzt, der Bestandteil einer "Wheatstone"-Gleichspannungsmeßbrücke war. Um eine möglichst große Kraftübertragung vom Muskelpräparat auf den Transducer zu erhalten, wurde das Silikonharzblöckchen mit dem Muskel so in der Versuchskammer fixiert, daß die Muskelfasern parallel zur Kraftaufnahme-richtung des Wandlers verliefen. Der Haken des Transducers wurde am Sehnenrand eingehängt, und die Minutiennadeln wurden anschließend an dieser Stelle des Präparates entfernt. Zur Temperierung der Badflüssigkeit wurde die doppelwandige

Versuchskammer von einer Glycerin-Wasser-Mischung durchströmt, die durch ein Kühlaggregat gepumpt wurde. Die Temperatur der Badlösung in der Versuchskammer wurde auf Werte zwischen 6 und 15 °C eingestellt. Die jeweilige Badtemperatur in den einzelnen Experimenten ist den Kapiteln des Ergebnisteils zu entnehmen. Sie wurde fortlaufend mit einem Thermistor gemessen und auf einem Digitalvoltmeter angezeigt. Für einen Wechsel der Badflüssigkeit wurden vorgekühlte Lösungen benutzt, um eine möglichst rasche Temperatureinstellung zu erreichen. Die Versuchsdaten (Membranpotential, Strom und isometrische Kraftentwicklung) wurden mit einem 4-Kanal Tonbandgerät (Bell & Howell, VR3200) aufgezeichnet. Zur direkten Beobachtung im Experiment wurden die Meßwerte auf einem Speicheroszilloskop (Tektronix, 5103N) dargestellt und zusätzlich von einem Schreiber (Schwarzer) registriert. Die Auswertung der auf Magnetband gespeicherten Meßdaten und deren graphische Darstellung erfolgte mit einem zweiten Schreiber (Servogor).

2.4 Versuchsablauf

Für die meisten Versuche wurden die Badlösungen A - E verwendet. Die Präparation wurde in der Standard-Ringer-Lösung (Lsg.A) vorgenommen, mit der auch die Versuchskammer zu Beginn der Experimente gefüllt war. Nach Anbringen des Transducerhakens am Präparat (bei den Kraftmessungen) und Überprüfung der Elektroden wurde zunächst ein Wechsel auf die Sulfat-Ringer-Lösung (Lsg. B bzw. C) durchgeführt. Dieser Schritt diente dem Austausch der Chlorid-Ionen gegen die impermeablen Sulfat-Ionen und damit der Erhöhung des Membranwiderstandes. Nach 5 Minuten erfolgte ein erneuter Lösungswechsel auf die TEA-Lösung (Lsg. E bzw. F). Hierbei wurde Natrium durch den K⁺-Kanalblocker TEA⁺ ersetzt. Einige Experimente wurden in Ca²⁺- und Mg²⁺-freier Sulfat-Ringer-

Lösung (Lsg.D) vorgenommen. Der Lösungswechsel erfolgte in diesen Fällen direkt von der Ringer-Lösung auf Lösung D, wobei die Versuchskammer mehrmals durchspült wurde, um einen möglichst vollständigen Lösungsaustausch zu gewährleisten. Die Präparation für die Versuche mit Na^+ - bzw. Li^+ -Lactat wurde in HEPES-Ringer-Lösung (Lsg.G) durchgeführt. Nach Abschluß aller Vorbereitungen wurde dann der Lösungswechsel von Lösung G auf Lösung H (Na^+ -Lactat) oder Lösung I (Li^+ -Lactat) vorgenommen. Grundsätzlich wurde nach jedem Austausch der Badflüssigkeit so lange gewartet, bis die Temperatur der Lösung in der Kammer die eingestellte Solltemperatur ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) erreicht hatte. Nach dem Einschalten der Klemme wurde ein Haltepotential (HP) von in der Regel -90 oder -100 mV eingestellt. Das jeweilige HP ist in der Versuchsbeschreibung angegeben. Hieran anschließend wurde eine Wartezeit von 5 Minuten eingehalten, bevor das betreffende Pulsprogramm gestartet wurde. In gleicher Weise wurde nach einer Änderung des Haltepotentials während des Experiments verfahren. Die Bestimmung des Schwellenpotentials zur Kontraktionsauslösung (Kap.3.2) erfolgte unter optischer Kontrolle bei 40-facher Vergrößerung mit einem Binokular. Bei vorgegebener Pulsdauer wurde die Amplitude des Testpulses, ausgehend von -70 mV, so lange schrittweise um jeweils 3 mV erhöht, bis eine Zuckung der Faser auftrat. Darauf wurde die Pulshöhe in 2 mV-Schritten wieder reduziert, bis keine Kontraktion mehr zu beobachten war. Das Potential, bei dem gerade noch eine Bewegung der Faser registriert werden konnte, wurde als Schwellenpotential notiert. In den Experimenten, in denen Kontraktionen bzw. Kontrakturen ausgelöst wurden, betrugen die zeitlichen Abstände zwischen den Pulsen - soweit nicht anders angegeben - 4 bis 5 Minuten. Bei den Strommessungen wurde ein Pulsabstand von 1 bis 2 Minuten eingehalten. Die verschiedenen Pulsprogramme zu den anderen Experimenten sind in den betreffenden Kapiteln des Ergebnisteils erläutert.

2.5 Die lichtinduzierte Inaktivierung von Nifedipin

Bei dem Ca^{2+} -Antagonisten Nifedipin handelt es sich um ein 1,4-Dihydropyridin, das bei Belichtung mit sichtbarer und ultravioletter Strahlung in ein unwirksames Nitroso-Derivat übergeht (EBEL, SCHÖTZ & HORNITSCHKE, 1978, s. Abb. 2). Als Lichtquelle wurde im Versuch eine Quecksilber-Hochdruckdampflampe (HBO 150, Osram) eingesetzt. Die Lampe war in einem Gehäuse mit Kondensor eingebaut. Der Lichtstrahl wurde von einer Sammellinse gebündelt und über einen Umlenkspiegel auf die Versuchskammer gerichtet. Das Lampengehäuse war außerhalb des übrigen Versuchsaufbaus auf einem Schwenktisch montiert und wurde erst unmittelbar vor der Bestrahlung des Präparates in Position gebracht. Für die Aufhebung der durch Nifedipin verursachten Blockierung des Ca^{2+} -Einstroms reichte oft schon eine Belichtungszeit von 10 bis 15 s. In den später aufgeführten Untersuchungen zum Einfluß von Nifedipin auf die Kraftentwicklung wurde meist eine Belichtungsdauer von 60 s gewählt, um eine möglichst vollständige Inaktivierung des Antagonisten zu gewährleisten. Vorversuche ergaben, daß eine Belichtung ohne Nifedipin keinen Einfluß auf den Ca^{2+} -Einstrom oder auf das Kontraktionsverhalten der Faser hatte. Die durch Nifedipin erzielten Effekte ließen sich zudem an derselben Faser nach Bestrahlung und erneuter Zugabe des Antagonisten mehrmals reproduzieren, so daß eine Schädigung der Fasern durch die Bestrahlung als Ursache für die beobachteten Phänomene ausgeschlossen werden kann. Der Ca^{2+} -Agonist BAY K8644 erwies sich im Experiment als wesentlich lichtstabiler. Die durch diese Substanz bewirkte Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms konnte auch durch längere Belichtung nicht rückgängig gemacht werden. Dieser Umstand schränkte die praktische Anwendung von BAY K8644 erheblich ein, da in den meisten Versuchen zur eindeutigen Feststellung einer

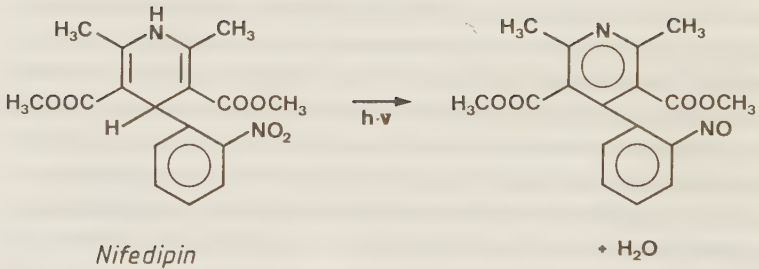


Abb. 2 Die lichtinduzierte Umwandlung von Nifedipin

Nifedipin geht durch Belichtung mit sichtbarem und ultraviolettem Licht unter Rearomatisierung zur Pyridinverbindung in ein unwirksames Nitroso-Derivat (4-(2'-Nitrosophenyl)-2,6-dimethylpyridin-3,5-dicarbonsäure-dimethylester) über.

(verändert nach EBEL, SCHÜTZ & HORNITSCHKE, 1978)

Wirkung eine abschließende Kontrolle notwendig war. Alle Versuche mit Nifedipin oder BAY K8644 wurden im abgedunkelten Labor bei gedämpfter Raumbelichtung durchgeführt. Um langfristig eine Akkumulation von Nifedipin bzw. BAY K8644 in der Versuchskammer und in der Schlauchzuleitung zu vermeiden, wurden diese am Ende jedes Versuchstages mit Ethanol gereinigt.

2.6 Auswertung der Stromaufzeichnungen

Um eine Strom-/Spannungsbeziehung für den Ca^{2+} -Kanals aufstellen zu können, war es notwendig, alle anderen Stromkomponenten (Ionenströme durch andere Kanäle, Leckströme) weitgehend auszuschalten. Diese Forderung wurde zum Teil durch die Verwendung von Sulfat an Stelle von Chlorid und durch TEA und TTX erfüllt. Es verblieb jedoch ein Leckstrom, der meist im Verlauf des Experimentes zunahm. Weiterhin zeigte sich, daß durch TEA keine vollständige Blockierung der K^{+} -Kanäle erreicht werden konnte. In einigen Fällen wurde eine Auswertung der Ca^{2+} -Ströme durch diese Stromkomponente verhindert. Oft traten diese Störungen bei starken Depolarisationen der Fasern auf. Ein gängiges Verfahren zur Eliminierung von Leckströmen bei der Auswertung ist das Vorschalten eines Pulses im Experiment, dessen Amplitude die Schwelle für den Ca^{2+} -Strom nicht erreichen darf (z.B. von -90 mV auf -60 mV). Die Stromantwort auf diesen Vorpuls wird auf die Höhe des Testpulses skaliert und dann von dessen Stromaufzeichnung subtrahiert. Die Methode liefert jedoch keine Korrektur für Ströme, die erst oberhalb der Amplitude des Vorpulses aktiviert werden oder deren Höhe sich nicht proportional zur Pulsamplitude verhält. Zudem besteht die Gefahr, daß der Leckstrom zwischen Vor- und Testpuls zunimmt. Eine anderes Verfahren besteht darin, den Ca^{2+} -Kanal nach jedem Testpuls vollständig zu blockieren und anschließend

einen Referenzpuls gleicher Amplitude zu applizieren. Der Ca^{2+} -Strom wäre in diesem Fall - gleiche Leckströme vorausgesetzt - die Differenz beider Strompulse. Dieses Vorgehen scheiterte hier an der praktischen Durchführbarkeit, da man eine Substanz benötigen würde, die selektiv nur den Ca^{2+} -Kanal vollständig blockiert, ohne andere Ionenleitfähigkeiten zu beeinflussen, und deren Wirkung zudem reversibel sein müßte, um mehr als einen Meßwert an einer Faser zu erhalten. Bei der Auswertung der Ca^{2+} -Ströme wurde im Rahmen dieser Arbeit eine andere Methode gewählt, die u.a. von McDONALD & TRAUTWEIN (1978) beschrieben wurde (s. Abb. 3). Es wurde jeweils die Differenz aus den Stromamplituden des Ca^{2+} - "peaks" und des Pulsendes (nach Inaktivierung des Ca^{2+} -Einstroms) gebildet. Dieser Wert stellte jeweils den maximalen Ca^{2+} -Einstrom für das betreffende Membranpotential dar. Auch diese Auswertungsmethode kann nur eine Annäherung an den tatsächlichen Wert liefern. Sie geht von der vereinfachenden Annahme aus, daß der den Ca^{2+} -Strom überlagernde Ionenstrom während des Pulses konstant bleibt. Die von einigen Autoren beschriebene Methode der Kontraktionsunterdrückung durch hypertone Badlösungen hatte sich in Vorversuchen nicht bewährt. Die Ca^{2+} -Ströme in diesen Lösungen waren meist sehr gering und konnten an vielen Fasern überhaupt nicht mehr ausgelöst werden. Um dennoch Kontraktionsartefakte bei den Strommessungen in der TEA-Lösung (Lsg. E) weitgehend auszuschalten, wurden die Muskelfasern beim Feststecken des Präparates stärker vorgedehnt. Für die übrigen Versuche zu dieser Arbeit war eine genaue quantitative Auswertung der Ca^{2+} -Ströme nicht notwendig. Die Stromaufzeichnungen dienten hier in erster Linie als Kontrolle, um festzustellen, ob eine Blockierung des Ca^{2+} -Kanals vorlag bzw. ob die lichtinduzierte Inaktivierung des Nifedipins erfolgreich war.

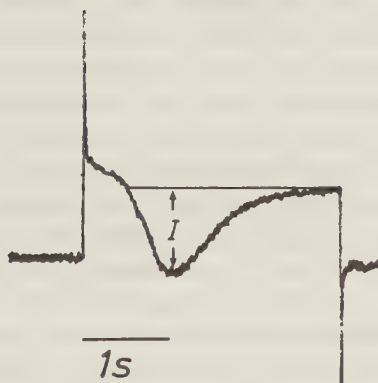


Abb. 3 Methode der Stromauswertung zur Aufstellung einer I/U-Beziehung
Die Differenz aus den Stromamplituden zum Zeitpunkt des Ca^{2+} -
"peak" und zum Ende des Pulses wurde als Maximum des Ca^{2+} -Ein-
stroms beim jeweiligen Potential gewertet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Die Potentialabhängigkeit des Ca^{2+} -Einstroms

Die Strom-/Spannungskennlinie stellt ein Merkmal zur Charakterisierung und Identifizierung eines Ionenstroms durch einen bestimmten Ionenkanal dar. Einige wichtige Parameter sind hierbei das Schwellenpotential zur Auslösung des Stroms, das Potential, bei dem der Strom sein Maximum erreicht, und sein Umkehrpotential. Mit Kenntnis der Kanaldichte und der Membranoberfläche oder durch Einzelkanalableitungen mit der "patch clamp"-Methode lassen sich auch Aussagen über die Kanalleitfähigkeit machen. Die gerade beim Ca^{2+} -Strom störenden Überlagerungen durch andere Stromkomponenten sowie zusätzlich auftretende Phänomene, wie das Abnehmen des Ca^{2+} -Stroms über einen längeren Zeitraum (run down), erschweren die Analyse (s.Kap.2.6). Bei der in Abb.4 dargestellten Strom/Spannungskurve sind daher Einschränkungen zu treffen bezüglich der Genauigkeit der Meßwerte. Die Messungen wurden bei 14 °C in TEA-Lösung (Lsg.E) an zwei Fasern (unterschiedliche Symbole) vorgenommen. Das Haltepotential betrug jeweils -90 mV. Die Amplituden der 3 s dauernden Testpulse sind auf der Abszisse aufgetragen. Die Ordinate stellt die Höhe des Ca^{2+} -Einstroms in relativen Einheiten, bezogen auf das Maximum, dar. Die Meßpunkte wurden von Hand durch eine Kurve miteinander verbunden. Aus dem Schnittpunkt der Kurve mit der Abszisse ist das Schwellenpotential zur Aktivierung des Ca^{2+} -Stroms abzulesen. Es lag bei diesen Fasern zwischen -50 und -40 mV. Der Wert für das Schwellenpotential war je nach Faser recht großen Schwankungen unterworfen. Es zeigte sich weiterhin, daß die Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms von der Temperatur beeinflusst wird. Bei niedrigeren Temperaturen wurde oft erst bei Depolarisationen auf Werte positiver als -30 mV ein Ca^{2+} -Strom festgestellt.

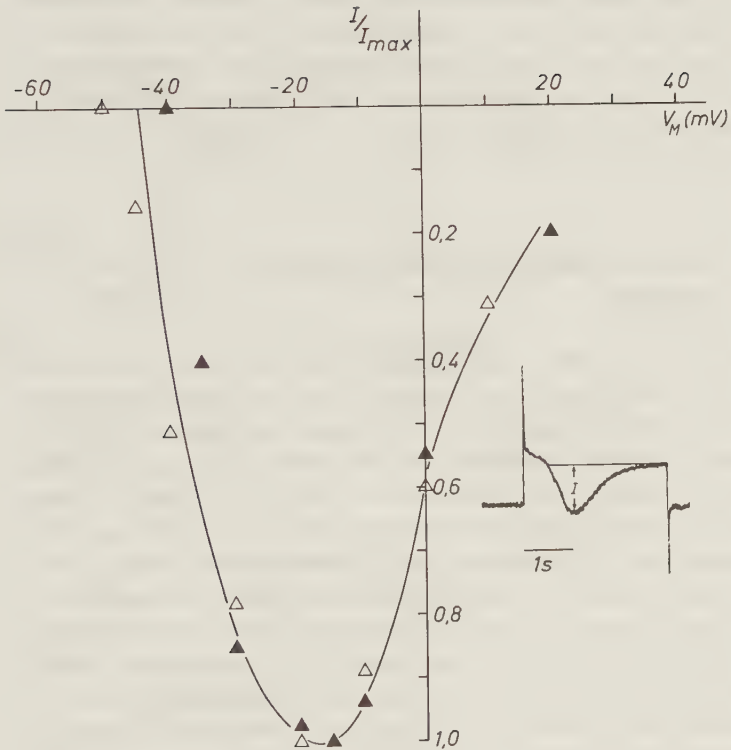


Abb. 4 Strom-/Spannungsbeziehung für den L-Typ Ca^{2+} -Kanal
Messungen an zwei Fasern (Δ,▲) in TEA-Lsg. (Lsg.E) bei 14 °C;
HP: -90 mV; Pulsdauer: 3 s; Abszisse: Pulspotential; Ordinate:
Stromamplitude bezogen auf das Maximum; Einschub: Methode der
 Ca^{2+} -Stromauswertung (s. Kap. 2.6).

Das Maximum des Stroms wurde hier bei einem Potential von etwa -20 mV erreicht. Rechnet man die ermittelten Ströme auf die Membranfläche um, so ergeben sich für die Amplitude des maximalen Ca^{2+} -Einstroms Werte von 25,4 (Δ) bzw. 21,7 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($\blacktriangle$). Bei diesen Berechnungen wurde ein mittlerer Faserdurchmesser von 50 μm und eine durchschnittliche Faserlänge von 1,3 mm zugrunde gelegt. Das Umkehrpotential konnte experimentell nicht ermittelt werden, da in diesem Potentialbereich ein starker Ausstrom (wahrscheinlich von Kalium getragen) eine Auswertung der Ca^{2+} -Ströme verhinderte.

3.2 Die Wirkungen von Nifedipin und BAY K8644 auf den Ca^{2+} -Einstrom

Nifedipin und BAY K8644 gehören derselben Substanzklasse an, den 1,4-Dihydropyridinen, zeigen aber unter physiologischen Bedingungen entgegengesetzte Wirkungen auf den L-Typ Ca^{2+} -Kanal. Während Nifedipin als Ca^{2+} -Antagonist den Kanal blockiert, fördert BAY K8644 den Ca^{2+} -Einstrom. Beiden Pharmaka ist gemeinsam, daß sie am Herzen schon in nanomolaren Konzentrationen wirksam sind. Ein entscheidender Vorteil bei der Verwendung von Nifedipin ist seine hohe Lichtempfindlichkeit (s.Kap. 2.5) und die damit verbundene Möglichkeit einer raschen Inaktivierung dieses Ca^{2+} -Antagonisten durch Belichtung. In der Abb.5 ist an Hand eines Beispiels die Blockierung des Ca^{2+} -Kanals nach Applikation von 1 μM Nifedipin zur Badlösung (Lsg.E) dargestellt. Die Temperatur in der Versuchskammer betrug 6 °C. Der Ca^{2+} -Einstrom wurde durch depolarisierende Pulse von -90 mV (HP) auf 0 mV ausgelöst. Die Pulsdauer betrug 10 s. Die Auftragungen zeigen den gemessenen totalen Membranstrom ohne Abzug von Leckströmen. Der Ca^{2+} -Einstrom ist an seinem transienten Verlauf und an der relativ langsamen Kinetik zu erkennen. Das Maximum

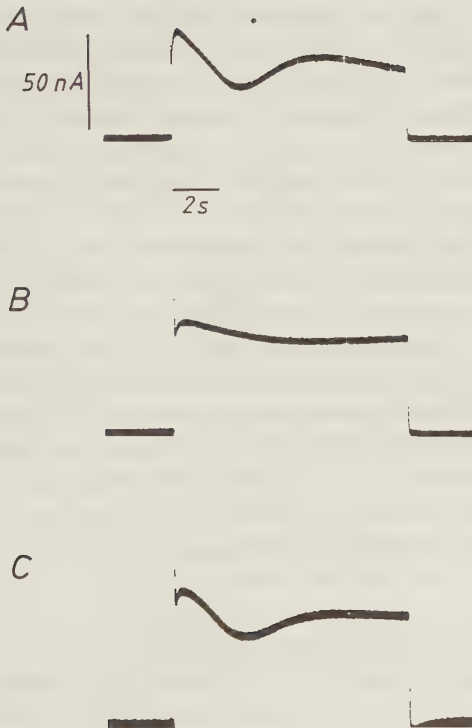


Abb. 5 Aufhebung des Ca^{2+} -Kanalblocks durch Inaktivierung von Nifedipin
Membranströme einer Faser unter Normalbedingungen (A), nach Zugabe
von Nifedipin (B), und nach Belichtung (C); Badlösung: TEA-Lsg.
(Lsg.E); $T=6^\circ\text{C}$; HP: -90 mV ; Pulse: 10 s auf 0 mV; Nifedipinkon-
zentration: $1\text{ }\mu\text{M}$; Belichtungsdauer: 15 s.

des Einstroms wurde erst 3 s nach Pulsbeginn erreicht. Die untere Teilabbildung (C) zeigt, daß eine Bestrahlung von wenigen Sekunden Dauer genügte, um die Kanal-Blockade wieder aufzuheben. Der Ca^{2+} -Strom wies in diesem Beispiel nach der Belichtung nicht mehr die Ausgangsamplitude auf. Dies kann auf eine unvollständige Umwandlung des Antagonisten, aber auch auf den schon erwähnten "run down" des Ca^{2+} -Stroms zurückgeführt werden. Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen an Nifedipin ergaben, daß unter den aufgeführten Bedingungen ab etwa 400 nM eine vollständige Hemmung des Ca^{2+} -Kanals eintrat. Dabei konnten keine Abstufungen in der Wirkung beobachtet werden. Die Ergebnisse lassen daher auf einen sehr steilen Verlauf der Dosis-Wirkungskurve schließen. Der Wirkungseintritt von Nifedipin war meist schon 2 min nach Lösungswechsel feststellbar. Allerdings war das Ausmaß der Ca^{2+} -Stromblockade in vielen Fällen beim ersten Testpuls nach der Nifedipinapplikation noch nicht maximal und konnte durch nachfolgende Depolarisationen gesteigert werden. Diese Befunde stützen die Hypothese, daß der Ca^{2+} -Antagonist bevorzugt an den inaktivierten Kanal bindet. Es war jedoch in Gegenwart von Nifedipin nicht möglich, die Blockierung des Ca^{2+} -Kanals durch Hyperpolarisation der Faser (für 10 min auf -150 mV) wieder aufzuheben.

Die Wirkung des Ca^{2+} -Agonisten BAY K8644 auf den L-Typ Ca^{2+} -Kanal ist in Abb.6 aufgeführt. In A sind die an einer Faser gemessenen Membranströme bei Depolarisationen für jeweils 10 s auf die angegebenen Potentiale dargestellt. Der Versuch wurde in TEA-Lösung (Lsg.E) bei 6 °C und einem HP von -90 mV durchgeführt. Die Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms war zuerst bei -40 mV erkennbar. Mit zunehmender Depolarisation wurde sowohl ein Anstieg in der Amplitude des Stroms als auch eine Beschleunigung seiner Kinetik registriert. Die untere Reihe zeigt die Membranströme derselben Faser nach Zugabe von 1 μM BAY K8644. Unter dem Einfluß des Agonisten wurde

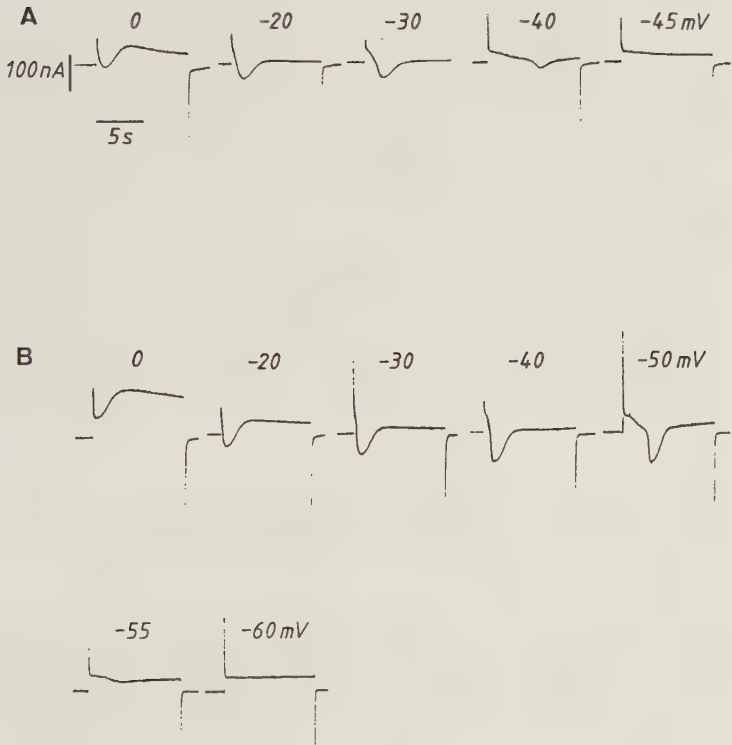


Abb. 6 Membranströme an einer Faser vor (A) und nach (B) Applikation von 2 μ M BAY K8644. Badlösung: TEA-Lsg. (Lsg.E); $T=6^{\circ}\text{C}$; HP: -90 mV; Pulse: 10 s auf die angegebenen Potentiale.

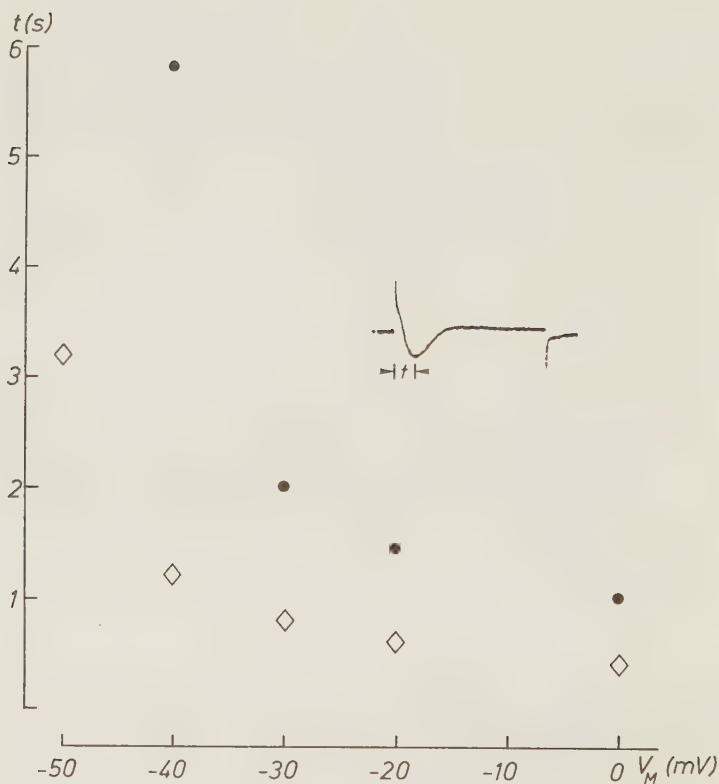


Abb. 7 Die Aktivierungskinetik des Ca^{2+} -Stromes

Abszisse: Pulspotential; Ordinate: Zeit zwischen dem Beginn des Pulses und dem Erreichen des Ca^{2+} -"-peaks" (time to peak, s. Einschubdiagramm); der Auftragung liegen die Meßwerte der Abb.6 zugrunde; ●: Kontrolle; ◇: mit 2 μM BAY K8644 in der Badlösung.

die Potentialschwelle für die Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms schon bei -50 mV überschritten. Außerdem wurde eine Zunahme der Ströme bei allen Potentialen gemessen. Die Abb.7 zeigt, wie sich BAY K8644 auf die Aktivierungskinetik des Ca^{2+} -Einstroms auswirkt. Es wurden hier aus den Aufzeichnungen des gleichen Versuches die Zeiten vom Beginn der Pulse bis zum Erreichen der "peak"-Werte (time to peak) gegen das jeweilige Pulspotential aufgetragen. Die schwarzen Kreise repräsentieren die Meßwerte der Kontrolle. Die offenen Rauten stellen die Ergebnisse unter dem Einfluß des Agonisten dar. Wie der Abb.7 zu entnehmen ist, führte BAY K8644 zu einem schnelleren Anstieg des Ca^{2+} -Einstroms. Dieser Effekt machte sich besonders im Schwellenbereich (-40 mV) bemerkbar. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der Ca^{2+} -Agonist den Strom durch den Ca^{2+} -Kanal verstärkt, dessen Kinetik positiv beeinflußt und das Schwellenpotential zur Auslösung des Einstroms in Richtung negativerer Membranpotentiale verschiebt.

3.3 Der Einfluß von Nifedipin auf die Potentialschwelle zur Kontraktionsauslösung

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, ergeben sich aus einigen Untersuchungen anderer Autoren Hinweise darauf, daß am Skelettmuskel die DHP-Rezeptoren, zumindest zum Teil, mit den von SCHNEIDER und CHANDLER (1973) geforderten Potentialsensoren der elektro-mechanischen Kopplung identisch sind. Die nachfolgend aufgeführten Versuche gingen deshalb der Fragestellung nach, ob Nifedipin neben seiner Eigenschaft als Ca^{2+} -Einstromblocker auch die Kraftentwicklung an Skelettmuskelfasern beeinflußt. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Wirkung des Antagonisten auf die Potentialabhängigkeit der Kontraktionsauslösung bei unterschiedlich langen Depolarisationspulsen (Reizzeit-Spannungskurven) un-

tersucht. Das den Versuchen zugrundeliegende Pulsschema wurde schon in Kapitel 2.4 erläutert. Die Versuche wurden bei 6 °C in TEA-Lösung (Lsg.E) durchgeführt. Das Haltepotential betrug -90 mV. Die Abb.8 zeigt zwei Reizzeit-Spannungskurven, die hintereinander an derselben Faser aufgenommen wurden. Der Ca^{2+} -Antagonist wurde bereits vor Beginn des Experimentes in einer Konzentration von 2 μM der Badlösung zugesetzt. Die untere Kurve stellt die Verbindung der Meßpunkte her, die unter dem Einfluß von Nifedipin ermittelt wurden (●). Das Rheobasepotential belief sich auf ca. -75 mV. Im Anschluß an diese erste Meßreihe wurde die Versuchskammer für die Dauer von 60 s belichtet, um Nifedipin in seine inaktive Form zu überführen. Eine erneute Schwellenbestimmung bei 100 ms Pulsdauer ergab ein um 10 mV weniger negatives Potential (Δ). Das Ergebnis einer weiteren gleichlangen Bestrahlung stellt die obere Kurve dar (○). Die Meßwerte dieser Kurve entsprechen in etwa denen unter normalen Bedingungen, d.h. ohne Nifedipin in der Badlösung (Rheobase bei ca. -50 mV). Der Einfluß von Nifedipin zeigte sich in diesem Beispiel in einer Verschiebung der Reizzeit-Spannungskurve um mehr als 20 mV in hyperpolarisierender Richtung. Die Wirkung des Ca^{2+} -Antagonisten trat hierbei in der Regel nicht sofort vollständig ein, sondern konnte durch repetitive Reizung der Faser verstärkt werden. Daher wurden die Muskelfasern vor Aufnahme der eigentlichen Meßreihe in Gegenwart von Nifedipin mehrmals aktiviert, bis keine weitere Verschiebung des Schwellenpotentials mehr zu verzeichnen war. Weitere Versuche an anderen Fasern erbrachten ähnliche Resultate, wenngleich das Ausmaß der Schwellenverschiebung nicht immer so groß war wie in dem gezeigten Beispiel.

Um den unter rein optischer Kontrolle erhaltenen Befund zu erhärten, wurden Kraftmessungen mit dem Transducer unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Die Muskelfaser, deren Krafttransienten in Abb.9 dargestellt sind, wurde für

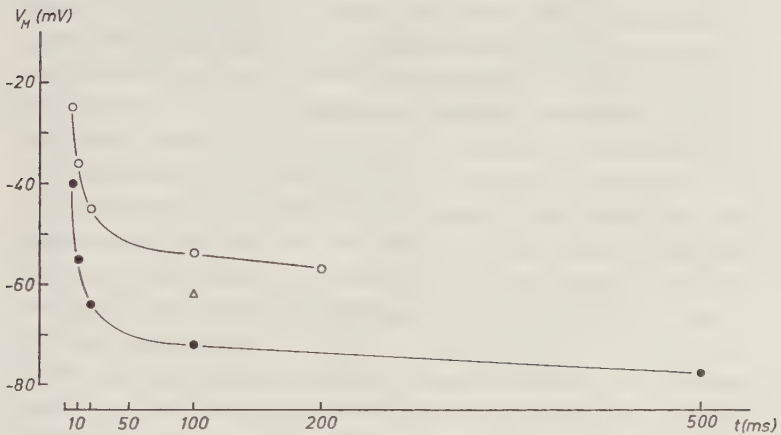


Abb. 8 Der Einfluß von Nifedipin auf die Reizzeit-Spannungskurve
Badlösung: TEA-Lsg. (Lsg.E); $T=6\text{ }^{\circ}\text{C}$; HP: -90 mV ; Abszisse:
Pulsdauer; Ordinate: Schwellenpotential;
●: Meßpunkte mit $2\text{ }\mu\text{M}$ Nifedipin in der Badlösung;
△: Meßpunkt bei 100 ms nach 60 s Belichtung;
○: Meßpunkte nach weiteren 60 s Belichtung;
Alle Meßwerte wurden an einer Faser aufgenommen.

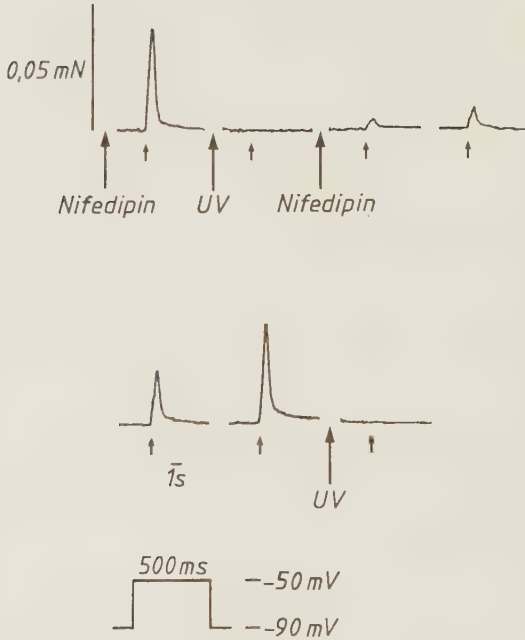


Abb. 9 Kraftmessungen unter Nifedipin-Einfluß im Schwellenbereich
Badlösung: TEA-Lsg. (Lsg.E); $T=6^{\circ}\text{C}$; HP: -90 mV ; Pulse: 500 ms
auf -50 mV (die kleinen Pfeile markieren den Pulsbeginn); Nifedipin: $2\text{ }\mu\text{M}$; UV: Belichtung, jeweils 60 s .

jeweils 500 ms von -90 mV (HP) auf -50 mV depolarisiert. Die Temperatur der Badlösung (Lsg.E) betrug wiederum 6 °C. In Gegenwart des Ca^{2+} -Antagonisten (2 μM) wurde bereits mit dieser Pulsamplitude eine meßbare Kraftentwicklung registriert. Nach 60 s Belichtung konnte mit einem zweiten Puls keine Kontraktion mehr ausgelöst werden. Erst die erneute Zugabe von Nifedipin führte bei gleicher Depolarisation der Faser wieder zu einer Kraftantwort. Die Amplitude betrug zunächst nur etwa 10% des Anfangswertes, erreichte aber im Laufe von drei weiteren Testpulsen wieder den Ausgangszustand. Das Ergebnis dieses Experimentes kann in Analogie zu den oben beschriebenen Schwellenmessungen interpretiert werden. Dabei ist davon auszugehen, daß der applizierte Puls bei dieser Faser unter normalen Bedingungen unterschwellig war. Aufgrund der durch Nifedipin bewirkten Schwellenverschiebung löste der gleiche Puls jedoch nach Zugabe des Antagonisten (bzw. vor der Belichtung) eine Einzelzuckung aus. Die Blockierung des Ca^{2+} -Einstroms scheidet hierbei als Ursache für das veränderte Kontraktionsverhalten aus. Wegen der langsamen Kinetik des Ca^{2+} -Stroms und dessen relativ positiver Potentialschwelle fand eine Aktivierung des Ca^{2+} -Kanals in keinem der beiden Beispiele statt. Die beobachteten Effekte müssen demnach auf einem anderen Wirkungsmechanismus beruhen.

Es sollen an dieser Stelle noch zwei weitere Experimente angeführt werden, die zwar nicht unter dem Gesichtspunkt einer Schwellenbestimmung durchgeführt wurden, deren Ergebnisse aber einen weiteren Aspekt des oben geschilderten Phänomens darstellen. In den Versuchen wurden die Muskelfasern repetitiv für jeweils 200 ms auf 0 mV depolarisiert. Der zeitliche Abstand zwischen zwei Pulsen betrug 2 s. Die Badlösung (Lsg.E) war auf 10 °C gekühlt. Als Haltepotential wurde hier -70 mV eingestellt. Die obere Reihe in Abb.10 zeigt die Kraftantworten auf eine Serie von fünf Pulsen. Man

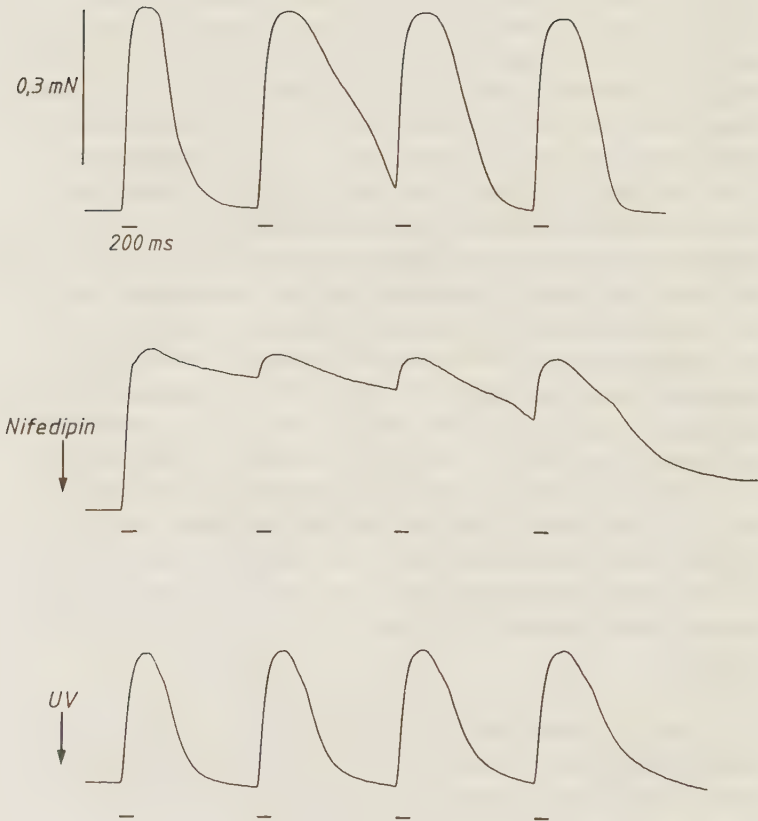


Abb. 10 Kontraktionen einer Faser bei HP -70 mV; Badlösung: TEA-Lsg. (Lsg.E); T=10 °C; Pulse: 200 ms auf 0 mV; Pulsabstand: 2 s; Nifedipin: 2 μ M; UV: 60 s Belichtung.

erkennt den steilen Anstieg der Kontraktion, gefolgt von einer kurzen Plateauphase, die, bedingt durch die Repolarisation am Pulsende, in die Erschlaffungsphase übergeht. Bei der zweiten Kontraktion ist eine Verzögerung in dieser letzten Phase zu beobachten. Dies führte zu einer Verbreiterung der Kontraktion, so daß bis zum Beginn der nächsten Depolarisation keine vollständige Erschlaffung mehr eintrat. Dieses Verhalten wurde wiederholt an einer zweiten Faser registriert (s. Abb.11). Die Ursache für das vorübergehende Auftreten einer Relaxationsverlangsamung beim zweiten Puls ist jedoch unklar. Nach Zugabe von $2\text{ }\mu\text{M}$ Nifedipin (mittlere Reihe) war die Erschlaffungsphase sehr stark beeinträchtigt. Dies zeigte sich in einem langen, nur wenig abfallenden Plateau zwischen den einzelnen Pulsen. Diese Erscheinung läßt sich durch eine Absenkung der Kontraktionsschwelle nach Nifedipinapplikation erklären. Die Muskelfaser wurde daher schon beim Haltepotential aktiviert. Allerdings trat der Effekt nie sofort nach dem Lösungswechsel auf, sondern erst nach einmaliger Kontraktionsaktivierung. Die untere Auftragung der Abb.10 stellt die Kontrolle nach Belichtung dar. Nach Abschalten des Pulses erfolgte wieder eine normale Relaxation der Faser. Die Kontraktionsamplituden waren insgesamt kleiner als bei der Kontrolle zu Beginn des Versuchs. Eine Abnahme der Kontraktionshöhe im Laufe des Experimentes trat in mehreren Fällen auf und ist wahrscheinlich auf eine Überbeanspruchung der Muskelfaser zurückzuführen. In der Abb.11 ist ein ähnlicher Versuch dargestellt. Auch hier wurde bei einem Haltepotential von -70 mV zunächst durch Nifedipinzugabe eine teilweise Unterdrückung der Kontraktionser schlaffung erzielt. Bei diesem Versuch wurde der Nifedipin-Effekt nicht durch Belichtung des Präparates aufgehoben, sondern stattdessen das Haltepotential auf -100 mV hyperpolarisiert. Dieses Potential war negativer als das Schwellenpotential der Kontraktion unter dem Einfluß von Nifedipin, so daß zwischen den Pulsen keine Relaxationsverzögerung

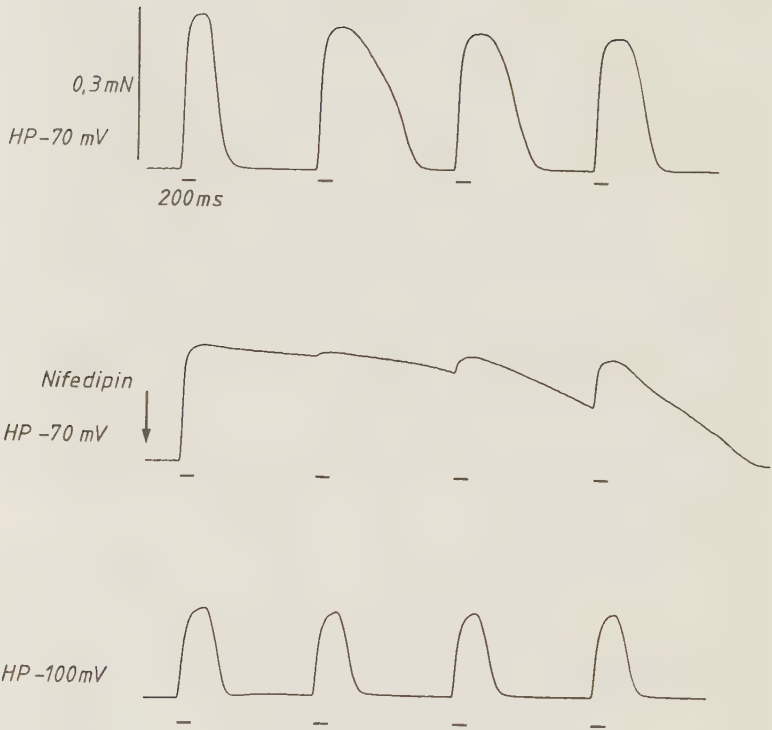


Abb. 11 Kontraktionen einer Faser bei HP -70 mV (obere und mittlere Auftragung) bzw. -100 mV (untere Spur); Badlösung: TEA-Lsg. (Lsg.E); T=10 °C; Pulse: 200 ms auf 0 mV; Pulsabstand: 2 s; Nifedipin: 2 μ M.

mehr auftrat (siehe untere Reihe).

3.4 Paralyseversuche mit Nifedipin

EISENBERG, McCARTHY und MILTON (1983) entdeckten bei ihren Experimenten mit D600, einem Ca^{2+} -Antagonisten aus der Gruppe der Phenylalkylamine, daß diese Substanz am Froschskelettmuskel einen Zustand hervorrufen kann, der durch einen Ausfall der potentialabhängigen Kraftentwicklung gekennzeichnet ist. Der Zustand, den die Autoren als "paralysis" bezeichneten, trat erst nach erfolgter Kraftentwicklung ein und wurde von ihnen nur bei niedrigen Versuchstemperaturen beobachtet. Eine Rückkehr aus dem paralysierten Zustand war durch Erwärmung oder durch Hyperpolarisation der Fasern möglich (LÖTTGAU, GOTTSCHALK & BERWE, 1987). Inzwischen wurde auch bei einigen anderen Ca^{2+} -Antagonisten eine paralyisierende Wirkung nachgewiesen (BOEHLE, GOTTSCHALK, NEUHAUS & LÖTTGAU, 1987). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob auch unter Nifedipin ein solcher stabiler inaktivierter Zustand eintritt. Für die Experimente wurde das gleiche Pulsprogramm verwendet, das mit D600 zu einer Paralyse führte (LÖTTGAU, GOTTSCHALK & BERWE, 1987). Die Badlösung (Lsg.E) wurde auf 6 °C gekühlt. Nifedipin wurde in einer Konzentration von 1 μM appliziert. Zur Kontrakturalösung und anschließenden Inaktivierung wurden die Muskelfasern für 3,5 min auf 0 mV depolarisiert. Danach erfolgte eine Repolarisation auf das Haltepotential (-90 mV) für die Dauer von 1,5 min, bevor die Faser erneut aktiviert wurde. Der Verlauf eines derartigen Experimentes ist in Abb.12 dargestellt. Die untere Spur gibt das Pulsschema wieder. Darüber sind die entsprechenden Kraftantworten aufgetragen. Es ist offensichtlich, daß zwischen den drei ausgelösten Kontrakturen hinsichtlich ihrer Amplitude kein signifikanter Unterschied besteht. Die leichte Verkürzung der Kontrakturen

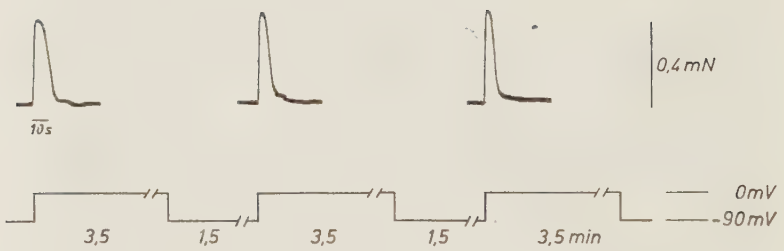


Abb. 12 Paralyseversuch mit Nifedipin

Badlösung: TEA-Lsg. (Lsg.E); $T=6^{\circ}C$; HP: $-90mV$; Pulse: $3,5min$ auf $0mV$; Pulsabstand: $1,5min$; Nifedipin: $1\mu M$.

nach dem zweiten Puls ist sicher nicht als eine beginnende Paralyse zu deuten, da ähnliche Effekte auch unter normalen Bedingungen beobachtet werden. Es zeigte sich auch in weiteren Versuchen, daß Nifedipin im Gegensatz zu D600 keine Paralyse auszulösen vermochte. Diese Beobachtung wird durch Experimente von McCLESKEY (1985) gestützt, der selbst mit 20 μM Nifedipin keine Paralyse erreichte. RIOS und BRUM (1987) stellten in ihren Versuchen mit dem Ca^{2+} -Indikator Antipyrilazo III fest, daß Nifedipin die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR beeinträchtigt. Parallel dazu konnten sie auch eine Reduktion intramembranaler Ladungsbewegungen (charge movements) beobachten, denen eine Rolle bei der elektromechanischen Kopplung zugeschrieben wird. Eine derartige Beeinflussung von Prozessen, die letztlich zur Kraftentwicklung führen, wurde von den Autoren aber nur bei relativ positiven Haltepotentialen gefunden (HP -70 mV). Bei einem HP von -100 mV zeigte Nifedipin keinen meßbaren Effekt auf die genannten Parameter. RIOS und BRUM (1987) interpretierten dieses Verhalten nach der "modulated receptor"-Theorie mit einer potentialabhängigen Bindung des Ca^{2+} -Antagonisten an den inaktivierten Rezeptor. Die Veröffentlichung dieser Ergebnisse gab den Anstoß zu einer Reihe von Experimenten, in denen die Wirkung von Nifedipin auf die Kraftentwicklung bei weniger negativen Haltepotentialen untersucht wurde. Zwei Beispiele hierfür wurden bereits in Kap.3.2 unter anderen Gesichtspunkten vorgestellt (Abb.10, 11). Es ließ sich jedoch auch unter diesen Versuchsbedingungen keine Beeinträchtigung der Kraftentwicklung feststellen.

3.5 Die Wirkung von Nifedipin auf die Kraftentwicklung in nominell Ca^{2+} -freien Lösungen

Bereits FLECKENSTEIN (1983) hatte in seinen Experimenten erkannt, daß die Wirkung der Ca^{2+} -Antagonisten von der extra-

zellulären Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst wird. So läßt sich die hemmende Wirkung dieser Substanzen am Herzmuskel durch Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im umgebenden Medium antagonisieren, während umgekehrt eine Erniedrigung der Konzentration an freiem Calcium die Wirkung der Ca^{2+} -Antagonisten verstärkt. Um zu testen, inwieweit die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration einen Einfluß auf die Nifedipineffekte am Skelettmuskel hat, wurden einige Versuche in nominell Ca^{2+} -freien Lösungen (d.h. ohne Zusatz von Ca^{2+} , Lsg.F) durchgeführt. Zur Kompensation von Oberflächenladungseffekten enthielten die verwendeten Lösungen eine äquivalente Menge an Mg^{2+} . Wie die nachfolgend beschriebenen Experimente zeigen, konnten unter diesen Bedingungen ähnliche Nifedipin-Wirkungen erzielt werden, wie sie von RIOS und BRUM (1987) mit der "cut fibre"-Methode gefunden wurden. In Abb.13 sind Kontraktionen einer Muskelfaser dargestellt, die durch Depolarisationen von -80 mV (HP) auf 0 mV ausgelöst wurden. Die Badtemperatur betrug 15 °C und die Dauer der applizierten Pulse 20 s. Die erste Aufzeichnung stellt eine normale Kontraktur in Ca^{2+} -freier Lösung dar, mit einer Plateauphase von ca. 1,5 s Dauer. Nach Zugabe von 4 μM Nifedipin wurde auf einen zweiten Reiz hin eine Kraftentwicklung beobachtet, die kein Plateau mehr erkennen ließ, sondern sehr schnell nach Erreichen des Maximums in die Relaxationsphase überging. Durch lichtinduzierte Inaktivierung des Ca^{2+} -Antagonisten konnte der Anfangszustand nahezu wiederhergestellt werden, wie die Kontrolle am Ende des Experimentes ergab. Eine Beschleunigung der Relaxation unter Nifedipin konnte auch in dem Experiment der Abb.14 festgestellt werden. Die Muskelfaser wurde repetitiv mit Pulsen von 3 s Dauer von -70 mV auf 0 mV depolarisiert. Der Pulsabstand betrug 3 s. Die obere Reihe zeigt fünf aufeinanderfolgende Kontraktionen, die mit 2 μM Nifedipin in der Badlösung aufgenommen wurden. Darunter ist die an derselben Faser vorgenommene Kontrolle nach Belichtung dargestellt. Die Kontraktionen beider Reihen zeigen mit

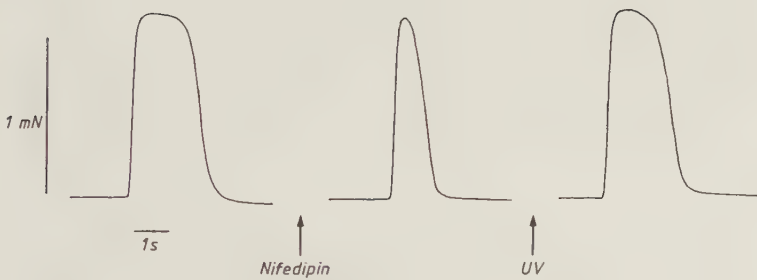


Abb. 13 Kontraktionen in nominell Ca^{2+} -freien Lösungen

Badlösung: TEA-Lsg. ohne Zusatz von Ca^{2+} (Lsg.F); $T=15^\circ\text{C}$;
HP: -80 mV ; Pulse: 20 s auf 0 mV ; Nifedipin: $4\text{ }\mu\text{M}$; UV: 60 s
Belichtung.

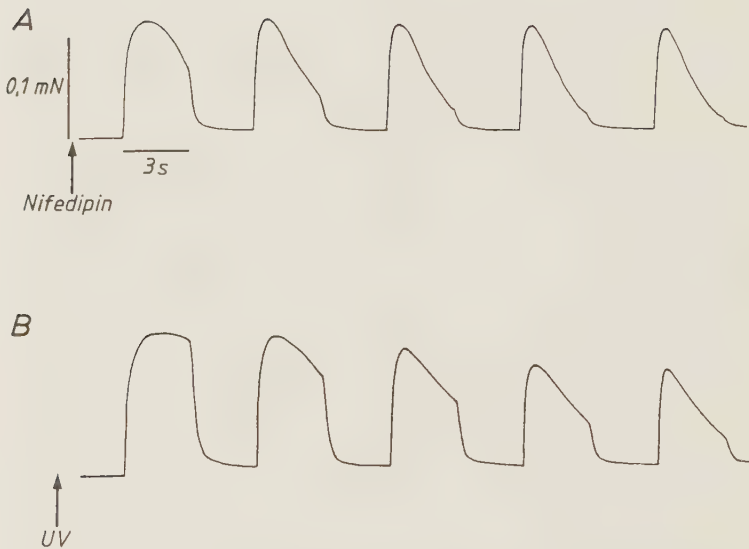


Abb. 14 Kontrakturfolgen in nominell Ca^{2+} -freien Lösungen
Badlösung: TEA-Lsg. ohne Zusatz von Ca^{2+} (Lsg.F); $T=15^\circ\text{C}$; HP: -70 mV ; Pulse: 3 s auf 0 mV; Pulsabstand: 3 s; A: mit $2\text{ }\mu\text{M}$ Nifedipin; B: nach 60 s Belichtung (UV) an derselben Faser.

Ausnahme der ersten Kraftentwicklung der Kontrolle keine ausgeprägte Plateauphase. Dem steilen Anstieg der Kraft zu Beginn der Depolarisation folgt eine spontan einsetzende Relaxation, bedingt durch die Inaktivierung der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung. Es fällt auf, daß dieser Prozeß im Laufe der Kontrakturfolge beschleunigt wird. Dies ist auch an der abnehmenden Kraftamplitude zum Zeitpunkt der Repolarisation zu erkennen. Ein Vergleich beider Reihen läßt deutlich erkennen, daß die Erschlaffungsphase unter dem Einfluß des Ca^{2+} -Antagonisten steiler verläuft. Ebenfalls ist unter Nifedipineinfluß (A) eine geringere Kontrakturmöhe beim ersten Puls zu verzeichnen. Die maximalen Kraftamplituden nahmen bei der Kontrolle im Verlauf der fünf Kontrakturen allerdings stetig ab. Vermutlich ist dies durch eine Überbeanspruchung der Muskelfaser zu erklären. Im Gegensatz zu dem in Kapitel 3.3 beschriebenen Phänomen erwies sich Nifedipin hier als eher hemmend auf die Kraftentwicklung. Diese Wirkung läßt sich, da statt Ca^{2+} das impermeable Mg^{2+} in der Badlösung enthalten war, nicht auf die Blockierung der Ca^{2+} -Kanäle zurückführen.

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob Nifedipin unter diesen Bedingungen auch die Inaktivierungskurve der Kraft beeinflusst. Um möglichst große Effekte zu erhalten, wurde der Badlösung (Lsg.F) zusätzlich 1 mM des Ca^{2+} -Chelators EGTA zugegeben, so daß sich die freie Ca^{2+} -Konzentration weiter reduzierte. Das Pulsprogramm für die Meßreihe zur Aufnahme der Inaktivierungskurven ist in der Abb.15 eingezeichnet. Als Haltepotential wurden -100 mV gewählt. Die Muskelfaser wurde zunächst für jeweils 4 min auf unterschiedliche Membranpotentiale vordepolarisiert. Das Potential dieser inaktivierenden Vorpulse ist auf der Abszisse aufgetragen. Anschließend wurde die noch vorhandene Restaktivität anhand der Kraftantwort einer 10 s dauernden Depolarisation auf 0 mV ermittelt. Die Kontraktionsamplitude ist

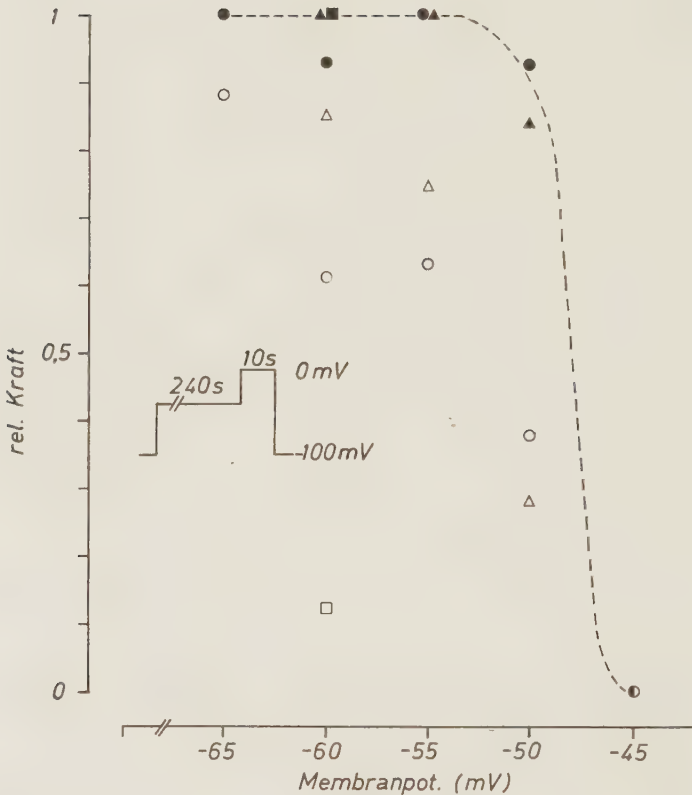


Abb. 15 Der Einfluß von Nifedipin auf die Inaktivierungskurve der Kraft
Badlösung: TEA-Lsg. ohne Zusatz von Ca^{2+} (Lsg.F) mit 1 mM EGTA;
 $T=15^\circ\text{C}$; HP: -100 mV; Pulsschema s. kleine Abb.; Abszisse:
Membranpotential des Vorpulses; Ordinate: Kraftentwicklung beim
Testpuls bezogen auf das Maximum (ohne Vorpuls);
●, ■, ▲: Kontrollen;
○, □, △: Meßwerte mit 2 μM Nifedipin;
gemessen an 9 Fasern (bei gleichem Potential bedeuten gleiche
Symbolformen Meßwerte an derselben Faser).

auf der Ordinate in relativen Einheiten angegeben. Der Wert "1" bedeutet dabei die maximale Kraftamplitude, die durch einen Testpuls von -100 mV auf 0 mV (ohne Vorpuls) erreicht wurde. Die Messung einer größeren Anzahl von Kontrakturen an einer Faser war unter den hier gegebenen Bedingungen praktisch kaum durchführbar, da der Entzug des extrazellulären Calciums eine destabilisierende Wirkung auf die Membran ausübte und die Klemme meist nach wenigen Kontrakturen zusammenbrach. Die Aufzeichnung von Kontrollmessungen und solchen mit Nifedipin an unterschiedlichen Muskelfasern wäre jedoch nur dann sinnvoll gewesen, wenn die Streuung der Meßwerte zwischen den einzelnen Fasern relativ gering und der Nifedipin-Effekt groß genug gewesen wäre. Es zeigte sich aber, daß bei gleicher Vordepolarisation und gleicher Nifedipin-Konzentration das Ausmaß der Inaktivierung an verschiedenen Fasern z.T. sehr stark differierte. Es wurde deshalb jeweils die Kontrolle und die Messung mit Nifedipin beim gleichen Potential an einer Faser gemessen. Zusätzlich mußte an jeder Faser ein Referenzpuls von -100 mV auf 0 mV gegeben werden, um die Kontraktionsamplituden auf das Maximum beziehen zu können. Das Ergebnis der Messungen ist in Abb.15 wiedergegeben. Die schwarz ausgefüllten Symbole bezeichnen die Kontrollen; die offenen Symbole stellen die Meßwerte mit 2 μ M Nifedipin dar. Bei gleichem Potential bedeuten gleiche Symbolformen, daß es sich um dieselbe Faser handelte. Durch die Meßpunkte der Kontrollen wurde gestrichelt der Verlauf einer Inaktivierungskurve gezeichnet. Da die entsprechenden Werte der Nifedipin-Meßreihe stärker streuten, erschien die Eintragung einer Kurve nicht sinnvoll. Die Abbildung zeigt, daß Nifedipin bei Vorpulsen zwischen -65 mV und -50 mV das Ausmaß der Inaktivierung verstärkt. In Anbetracht der dargelegten Schwierigkeiten bei den Messungen und der damit verbundenen Einschränkungen läßt sich aus den Experimenten kein exakter Wert für die Verschiebung der Inaktivierungskurve unter Nifedipin angeben.

Dieser und ähnliche Versuche lassen auf eine Verlagerung der Kurve um etwa 5-10 mV in hyperpolarisierender Richtung schließen.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche bestätigen einmal mehr, daß der Skelettmuskel für seine Kontraktionen nicht unmittelbar auf extrazelluläres Calcium angewiesen ist. Die Substitution von Ca^{2+} durch Mg^{2+} führt offenbar zu einer Sensibilisierung des Systems gegenüber Nifedipin. In einer weiteren Versuchsreihe sollte untersucht werden, welchen Einfluß der vollständige Entzug aller divalenten Kationen aus der Badlösung auf die hemmende Wirkung des Ca^{2+} -Antagonisten am Skelettmuskel ausübt. Die Versuche wurden in Anlehnung an Experimente von PIZARRO, FITTS und RIOS (1988) vorgenommen. Die Autoren haben mit der "cut-fibre"-Methode die Bedeutung di- und monovalenter Metall-Kationen für die Kontraktilität der Skelettmuskelfaser untersucht (s. Diskussion). Für die eigenen Experimente wurde eine Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Natriumsulfatlösung (Lsg.D) verwendet. Die Abb. 16 zeigt Kontrakturen einer Muskelfaser, die in dieser Lösung bei einer Badtemperatur von 15 °C aufgenommen wurden. Die Faser wurde für jeweils 10 s auf 0 mV depolarisiert. Das Haltepotential betrug zu Beginn des Versuchs -80 mV (obere Reihe in Abb.16). Die ausgelösten Kraftantworten waren sehr kurz, ohne erkennbare Plateauphase. Die Zugabe von 2 µM Nifedipin führte zu einer weiteren Verkürzung der Kontraktur und zu einer Abnahme der Kraftamplitude um ca. 25%. Die Reduktion der Kontrakturnhöhe konnte durch Photoinaktivierung des Nifedipins wieder aufgehoben werden. Anschließend wurde ein HP von -70 mV eingestellt (untere Reihe). Hierbei war eine partielle Inaktivierung der Kraftentwicklung zu verzeichnen - die Amplitude erreichte nur noch etwa 65% des Ausgangswertes (bei -80 mV). Nach erneuter Zugabe von Nifedipin war keine Kontraktur mehr auslösbar. Auch die Belichtung des Präparates konnte die Kontraktilität nicht wieder-

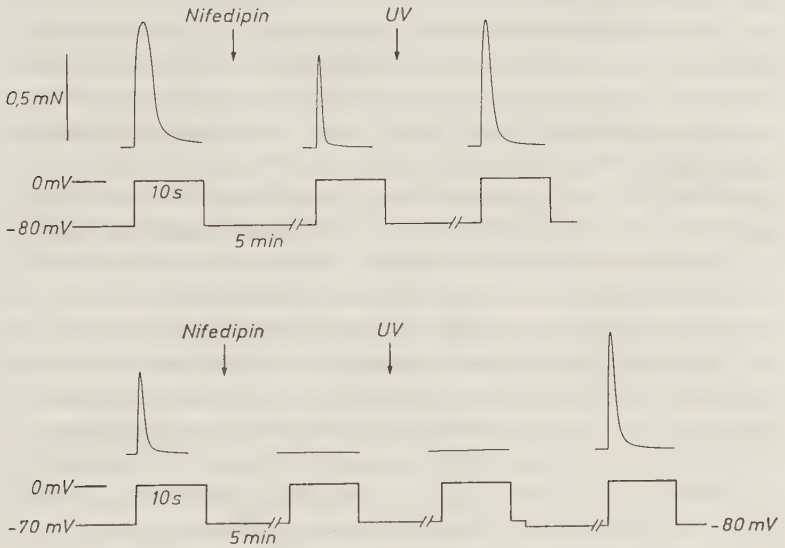


Abb. 16 Kontraktoren in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien Lösungen
 Badlösung: Lsg.D; $T=15^\circ\text{C}$; Pulse: 10 s auf 0 mV; HP: s. Puls-
 schema unter den Kontrakturen; Nifedipin: 2 μM ; UV: 60 s Belich-
 tung.

herstellen. Erst nach Hyperpolarisation der Faser auf -80 mV konnte durch erneute Depolarisation eine Kraftentwicklung beobachtet werden, deren Amplitude mit 94% fast wieder den Anfangswert erreichte. Dieser Versuch läßt vermuten, daß die hemmende Wirkung des Nifedipins in Lösungen ohne divalente Kationen noch stärker ausgeprägt ist als in Mg^{2+} -haltigen Versuchslösungen. Bei der Interpretation des Experimentes muß jedoch auch berücksichtigt werden, daß alle potential-abhängigen Prozesse - bedingt durch die fehlende Abschirmung negativer Oberflächenladungen - in hyperpolarisierender Richtung verschoben wurden. Dies trifft auch für die Inaktivierungskurve der Kraft zu. Das HP von -70 mV lag daher bereits nahe am steilen Bereich der Inaktivierungskurve, so daß die durch Nifedipin zusätzlich hervorgerufene Verschiebung der Kurve dazu führte, daß bei diesem HP keine Kontraktionen mehr ausgelöst werden konnten. Offensichtlich waren jedoch beim ersten Puls von -70 auf 0 mV vor Zugabe des Ca^{2+} -Antagonisten noch keine steady-state Gleichgewichtsbedingungen erreicht, da die Kraftantwort nach der Belichtung ausblieb. Wahrscheinlich wäre nach längerer Wartezeit bei -70 mV auch ohne Zugabe von Nifedipin ein Verlust der Kontraktilität eingetreten. Weitere Versuche, bei denen ähnlich wie in der Abb.15 das Inaktivierungsverhalten untersucht wurde, weisen ebenfalls auf vergleichbare Wirkungen des Nifedipins in den Lösungen F und D hin.

3.6 Der Zusammenhang zwischen Ca^{2+} -Einstrom und Kraftentwicklung

Die in diesem und im nachfolgenden Kapitel beschriebenen Versuche gingen der Fragestellung nach, inwieweit der Strom durch den Ca^{2+} -Kanal an der Kraftentwicklung beteiligt ist. Die Experimente nehmen Bezug auf Untersuchungen französischer Elektrophysiologen (ILDEFONSE et al., 1985; POTREAU &

RAYMOND, 1982). ILDEFONSE und Mitarbeiter postulieren eine zweite Kraftkomponente bei Kontrakturen, die durch den Ca^{2+} -Einstrom getragen wird. Die bisher beschriebenen eigenen Untersuchungen gaben keinen Hinweis auf die Beteiligung des Ca^{2+} -Einstroms an der elektro-mechanischen Kopplung. Meist wurde der Ca^{2+} -Kanal in den Experimenten, bedingt durch eine zu geringe Pulsdauer oder -amplitude, erst gar nicht aktiviert (s. Schwellenmessungen). Auch bei anderen Versuchen, in denen die Fasern jeweils vollständig depolarisiert wurden, ergab die Nifedipin-induzierte Blockierung der Ca^{2+} -Kanäle keine signifikante Änderung in der Kraftantwort. Bei den weiteren Untersuchungen wurde von der Überlegung ausgegangen, daß möglicherweise die Bedingungen für eine Einflußnahme des einströmenden Ca^{2+} auf die Kraftentwicklung bei vollständiger Depolarisation der Muskelfasern, d.h. bei maximaler Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR, nicht gegeben waren. Es wurden deshalb Kontraktorexperimente mit submaximaler Aktivierung der Fasern durchgeführt, wobei jedoch die Potentialschwelle zur Auslösung des Ca^{2+} -Einstroms nicht unterschritten werden durfte. In einem Versuch (Abb.17) wurde die Muskelfaser für jeweils 10 s von -90 mV auf -30 mV depolarisiert. Der Badlösung (Lsg.E) waren bereits vor dem Experiment 2 μM Nifedipin zugesetzt worden. Die Temperatur in der Versuchskammer betrug 15 °C. Die untere Spur zeigt die Kraftregistrierungen, während darüber die Membranströme dargestellt sind. Das Pulsschema zu diesem Experiment ist in der oberen Auftragung zu sehen. Unter A ist die erste unter Nifedipineinfluß ausgelöste Kontraktur abgebildet. Die Kraftentwicklung läßt eine stark ausgeprägte Plateauphase erkennen, die bis zum Ende des Pulses andauerte. Ein Ca^{2+} -Einstrom wurde erwartungsgemäß nicht registriert, da die Ca^{2+} -Kanäle in Gegenwart von Nifedipin blockiert waren. Das Präparat wurde anschließend für 60 s bestrahlt. Durch eine darauffolgende Depolarisation gleicher Dauer und Amplitude wurde eine zweite Kontraktur ausgelöst, die sich von der

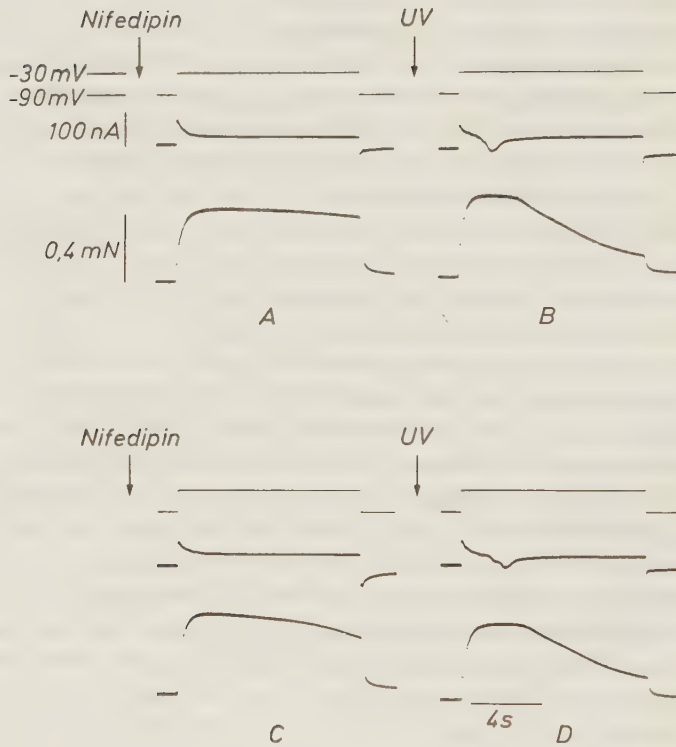


Abb. 17 Kraftentwicklungen einer Faser (untere Spur) mit Membranstrom (mittlere Spur) und Pulsprogramm (obere Spur); Badlösung: TEA-Lsg. (Lsg.E); $T=15^{\circ}\text{C}$; HP: -90 mV; Pulse: 10 s auf -30 mV; Nifedipin: 2 μM (in A und C); UV: 60 s Belichtung (vor B und D).

ersten Kraftentwicklung durch ein verkürztes Plateau unterschied (B). Etwa 3 s nach Beginn der Depolarisation setzte eine spontane langsame Erschlaffung ein. In der Stromspur ist der langsame Ca^{2+} -Einstrom zu erkennen; ein Indiz für die erfolgte Inaktivierung des Ca^{2+} -Antagonisten. Die erneute Zugabe von Nifedipin führte wieder zur Blockade der Ca^{2+} -Kanäle und zu der oben beschriebenen Verzögerung der Kraftinaktivierung (C). Unter D ist die Wiederaufhebung des Nifedipin-Effektes nach nochmaliger Bestrahlung gezeigt. Auffällig an diesem und ähnlichen Versuchen ist die Übereinstimmung der Zeitabläufe zwischen Ca^{2+} -Einstrom und dem Beginn der Kraftrelaxation. Die spontane Erschlaffung folgte dem Einstrom immer mit einer gewissen Latenz. Wurde die Pulsamplitude vergrößert, so setzten beide Ereignisse früher ein. Umgekehrt führte eine Reduzierung der Depolarisationsamplitude zu einer Verzögerung des Ca^{2+} -Einstromes, gekoppelt mit einer Verlängerung der Plateauphase. In Experimenten, in denen Cd^{2+} als anorganischer Ca^{2+} -Kanalblocker eingesetzt wurde, konnten ähnliche Verlängerungen der Kontraktionen beobachtet werden (LORKOVIC & RÜDEL, 1983). Ein Versuch zu der gleichen Fragestellung unter Anwendung eines Ca^{2+} -Agonisten (BAY K8644) ist in Abb.18 dargestellt. BAY K8644 fördert den Ca^{2+} -Strom durch den L-Typ Ca^{2+} -Kanal und verschiebt die Potentialschwelle zur Auslösung des Stroms in Richtung negativerer Werte. Die Temperatur der Badlösung (Lsg.E) betrug in diesem Experiment 10 °C. Die Muskelfaser wurde auf ein Haltepotential von -90 mV geklemmt. Die Kontraktionsauslösung erfolgte durch Depolarisation von 20 s Dauer auf -30 mV. Der erste Puls führte zu einer langandauernden Kraftentwicklung. Die Erschlaffung wurde erst durch die Repolarisation am Ende des Pulses eingeleitet. Der fehlende Ca^{2+} -Einstrom (obere Auftragung) läßt darauf schließen, daß das Potential zur Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle bei dieser Faser positiver als -30 mV war. Wie der Membranstrom des zweiten Pulses zeigt, führte BAY K8644 zu einer Erniedrigung dieser

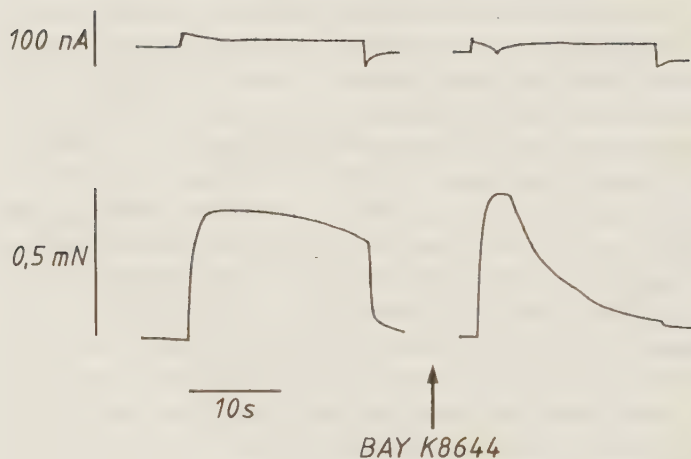


Abb. 18 Kontraktionen und Membranströme einer Faser vor und nach Applikation von 2 μ M BAY K8644; obere Spur: Membranstrom; untere Auftragung: isometrische Kraft; Badlösung: TEA-Lsg. (Lsg.E); $T=10^{\circ}\text{C}$; HP: -90 mV; Pulse: 20 s auf -30 mV.

Schwelle. Mit einer kurzen Verzögerung kam es nach dem Ca^{2+} -Einstrom wieder zu einer spontanen Erschlaffung. Der Ca^{2+} -Einstrom scheint demnach an der Kontraktionsauslösung selbst nicht beteiligt zu sein. Es konnte ebenfalls keine zweite, durch den Ca^{2+} -Einstrom getragene Kraftkomponente nachgewiesen werden (vergl. ILDEFONSE et al., 1985). Die hier geschilderten Experimente legen vielmehr den Schluß nahe, daß unter der Bedingung einer submaximalen Aktivierung der Ca^{2+} -Einstrom ein Auslöser für die spontane Relaxation während einer Depolarisation sein kann. Bei der Blockierung der Ca^{2+} -Kanäle würde dadurch der aktive Zustand der Faser länger aufrecht erhalten. Experimente mit Ba^{2+} als Ladungsträger, in denen dieser Effekt nicht auftrat, deuten darauf hin, daß es sich hierbei um einen Ca^{2+} -spezifischen Mechanismus handelt.

3.7 Versuche mit Na^+ - und Li^+ -Lactatlösungen

Die im folgenden aufgeführten Experimente wurden in Lösungen mit extrem niedriger Ca^{2+} -Konzentration ($<10^{-9}$ M) unter Verwendung des Ca^{2+} -Chelators EGTA vorgenommen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, verliert der Ca^{2+} -Kanal unter diesen Bedingungen seine hohe Selektivität und läßt auch andere di- oder monovalente Kationen permeieren. In den hier verwendeten Badlösungen wurden Na^+ - bzw. Li^+ -Ionen als Ladungsträger für den Strom durch den Ca^{2+} -Kanal in hoher Konzentration in Form ihrer Lactatsalze zugesetzt. Die Potentialschwelle für die Aktivierung des Na^+ -Einstroms lag im Vergleich zum Schwellenpotential für die Auslösung des Ca^{2+} -Stroms durch den gleichen Kanal bei sehr viel negativeren Werten (-75 bis -65 mV). Diese Verschiebung ist zumindest zum Teil durch die fehlende Abschirmung negativer Oberflächenladungen an der Membranaußenseite bedingt, da in den Lactatlösungen keine zweiwertigen Kationen enthalten waren. Parallel zum Na^+ -Ein-

strom wurde eine transiente Kraftentwicklung beobachtet. Sowohl der Na^+ -Strom als auch die begleitende Kontraktion ließen sich durch Blockieren des Ca^{2+} -Kanals hemmen. Dieser Effekt ist am Beispiel der Abb.19 veranschaulicht. Die betreffende Muskelfaser wurde auf ein Haltepotential von -100 mV geklemmt. Vorversuche hatten ergeben, daß bei niedrigeren Haltepotentialen oft eine partielle oder sogar vollständige Inaktivierung des Na^+ -Einstroms auftrat. Die Temperatur der Badlösung (Lsg.H) betrug 10 °C. Die Faser wurde für jeweils 4 s auf die angegebenen Potentiale depolarisiert. Die untere Auftragung gibt die gemessenen Kraftantworten wieder. In der oberen Reihe ist der Membranstrom während der Pulse aufgezeichnet. An den drei ersten Kontraktionen fällt auf, daß ihre Amplitude nicht (wie sonst) mit der Höhe des Depolarisationsschrittes korreliert ist. Die Kraftantwort bei -30 mV ist deutlich geringer als die bei Depolarisation auf -50 mV. Dagegen ist bei beiden Aufzeichnungen ein Zusammenhang zwischen der Kraftentwicklung und der Höhe des Na^+ -Einstroms zu erkennen. Die Kontraktionen waren insgesamt sehr kurz und wiesen kein Plateau auf. Nach Zugabe von 2 μM Nifedipin trat eine Blockierung des Na^+ -Stroms auf, die mit einem Verlust der Kontraktilität einherging. Selbst eine Depolarisation auf 0 mV blieb ohne erkennbare Kraftantwort. Die Belichtung des Präparates führte zur Wiederaufhebung der Kanalblockade. Gleichzeitig wurden wieder die oben beschriebenen Kontraktionen registriert. In einigen Experimenten, in denen mikromolare Konzentrationen von Ca^{2+} zur Blockierung der Na^+ -Ströme verwendet wurden, ließen sich die potentialabhängigen Kontraktionen weiterhin auslösen, während die Na^+ -Ströme und die Kraftentwicklungen im negativeren Potentialbereich ausblieben. Der Synchronismus beider Ereignisse (Na^+ -Einstrom und Kraftentwicklung), ihre gleiche pharmakologische Beeinflussbarkeit durch Nifedipin und die fehlende Korrelation der Kraftamplitude zum Membranpotential lassen vermuten, daß die

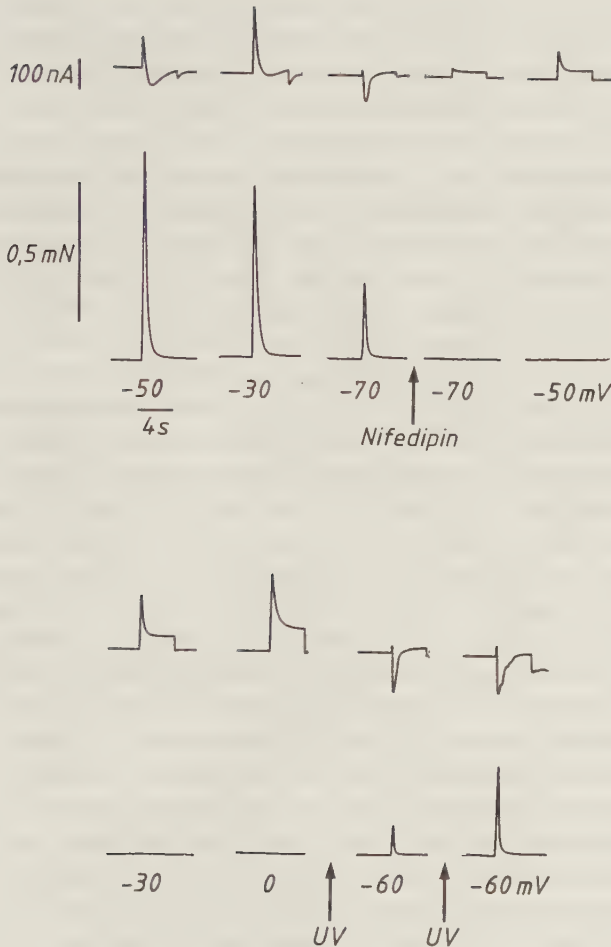


Abb. 19 Membranstrom und Kraftentwicklung in Na⁺-Lactatlösung
Badlösung: Lsg. H; T=10 °C; HP = -100 mV; Pulse: 4 s auf die angegebenen Potentiale; obere Reihe: Membranstrom; untere Reihe: Kraftauftragung; Nifedipin: 2 µM; UV: 60 s Belichtung.

hier beobachteten Kontraktionen eine Folge des Na^+ -Einstromes durch den Ca^{2+} -Kanal sind. Weiteren Aufschluß darüber sollten Experimente liefern, die eine Trennung der beiden Parameter aufgrund eventueller Unterschiede im Inaktivierungs- bzw. Restaurationsverhalten zum Ziel hatten. Hierzu wurden Versuche mit kurz aufeinanderfolgenden Depolarisationen durchgeführt (Doppelpulse), wobei der zeitliche Abstand zwischen den Pulsen variiert wurde. Das Ergebnis eines solchen Versuchs ist in Abb.20 gezeigt. Badlösung, Temperatur, Haltepotential und Pulsdauer waren unverändert zum Experiment in Abb.19. Die Muskelfaser wurde jeweils auf -60 mV depolarisiert. Die obere Auftragung in jeder Reihe zeigt den Membranstrom. Darunter sind die entsprechenden Kraftentwicklungen dargestellt. Bei dem ersten Doppelpuls betrug der Pulsabstand 5 s. In den Stromaufzeichnungen ist bei beiden Depolarisationen ein starker Na^+ -Einstrom zu erkennen. Die jeweiligen Kontraktionen haben in etwa die gleiche Amplitude. Bei dem zweiten applizierten Doppelpuls wurde das Intervall auf 3 s verkürzt. Hierbei trat sowohl in der Amplitude des Einstroms als auch in der Kontraktionshöhe eine Reduzierung beim zweiten Puls auf. Eine weitere Verringerung des Pulsabstandes führte zu einem vollständigen Ausbleiben von Strom und Kraft während der zweiten Depolarisation, dargestellt in der unteren Reihe der Abb.20 (Pulsabstand 2 s). Dieser Versuch und weitere ähnliche Experimente ergaben, daß eine "Isolierung" von Strom und Kraft unter den gewählten Bedingungen offensichtlich nicht möglich ist. Der Einstrom von Na^+ war immer von einer Kontraktion begleitet, und die Blockierung des Stroms durch Nifedipinzugabe oder durch Inaktivierung des Kanals führte gleichfalls zu einem Ausbleiben der Kontraktionen. Insoweit decken sich die hier erhaltenen Befunde mit Beobachtungen von POTREAU und RAYMOND (1982), die mit der "mannitol gap"-Technik ebenfalls durch Na^+ -Einstrom induzierte Kraftentwicklungen am Skelettmuskel erhielten.

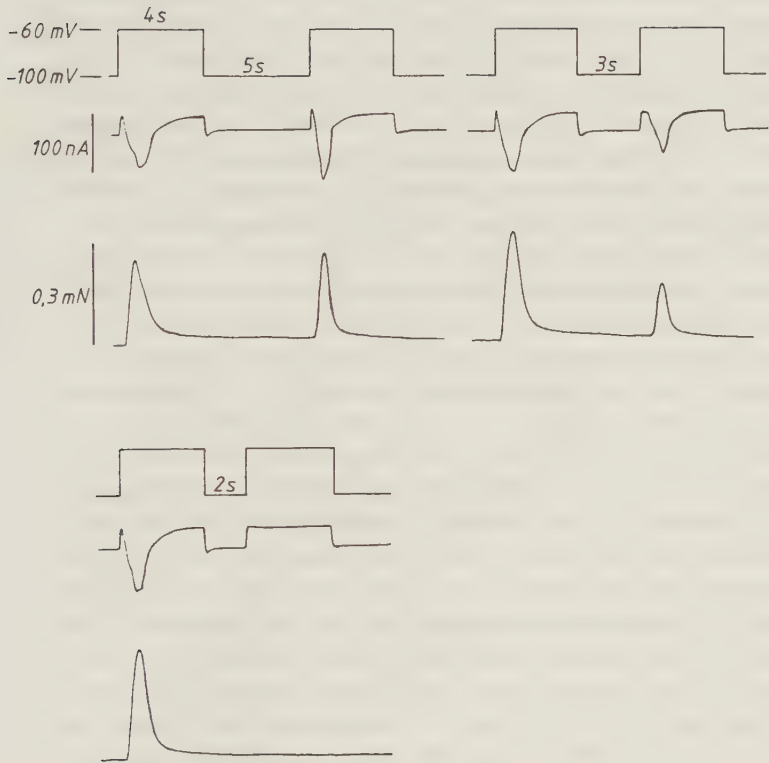


Abb. 20 Doppelpulsexperiment in Na⁺-Lactatlösung

Badlösung: Lsg.H; T=10 °C; HP: -100 mV; Pulse: 4 s auf -60 mV;
Pulsabstand: 2-5 s (s. Pulsprogramm, obere Spur); mittlere Spur:
Membranstrom; untere Spur: Kraftregistrierung.

Um zu überprüfen, ob der beschriebene Effekt Na^+ -spezifisch ist, wurde in einer zweiten Versuchsreihe Na^+ durch Li^+ ersetzt (Lsg.I). Es stellte sich heraus, daß unter vergleichbaren Versuchsbedingungen auch in Gegenwart von Li^+ bei Depolarisation ein Einstrom auftrat, der eine Kraftentwicklung hervorrief. Dabei war die Höhe des Einstroms wiederum mit der Kontraktionsamplitude korreliert. Wie in Abb.21 dargestellt, bewirkte die Zugabe von Nifedipin, wie zuvor in der Na^+ -Lactatlösung, eine reversible Blockierung von Strom und Kraft. Die Versuchsdaten sind dem Abbildungstext zu entnehmen. In der Abb.22 ist das Ergebnis eines Experiments mit Li^+ aufgezeichnet, bei dem ähnlich wie in Abb.20 versucht wurde, eine eventuelle Unabhängigkeit zwischen Strom und Kontraktion aufzuzeigen. Hierzu wurde das Haltepotential variiert und dabei der Grad der Inaktivierung von Li^+ -Einstrom und Kraftentwicklung festgestellt. Die Temperatur der Badlösung betrug 10°C . Die Faser wurde für jeweils 4 s auf -50 mV depolarisiert. Das eingestellte Haltepotential ist unter den Kraftregistrierungen (untere Reihe) angegeben. Die obere Auftragung stellt den Membranstrom dar. Bei dem Ausgangs-HP von -100 mV führte eine Depolarisation zu einem relativ großen Li^+ -Strom mit einer entsprechenden Kraftantwort. Im Anschluß wurde das HP auf -80 mV eingestellt. Ein zweiter Puls gleicher Amplitude blieb ohne Strom- und Kraftantwort. Das Haltepotential wurde schrittweise um je 5 mV erniedrigt, wobei auf jeder Potentialstufe ein Testpuls appliziert wurde. Bei -90 mV (HP) trat ein geringer Einstrom auf, ohne daß eine Kontraktion registriert werden konnte. Die Hyperpolarisation auf ein HP von -95 mV ergab eine Verstärkung des Li^+ -Stroms und parallel dazu eine Kraftentwicklung. Beide Parameter ließen sich durch eine weitere Hyperpolarisation vergrößern. Dieser Versuch ergab keinen signifikanten Unterschied im Inaktivierungsverhalten von Einstrom und begleitender Kontraktion. Die fehlende Kraft-

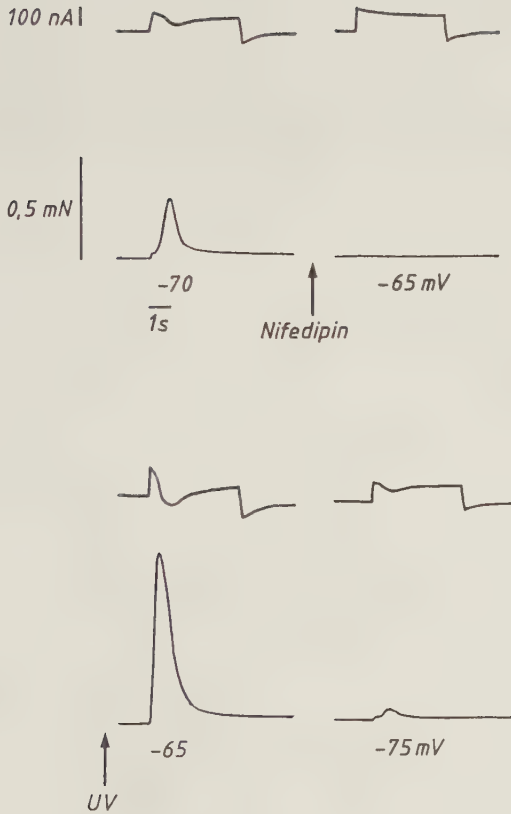


Abb. 21 Membranstrom und Kraftentwicklung in Li^+ -Lactatlösung
Badlösung: Lsg.I; $T=15^\circ\text{C}$; HP: -100 mV ; Pulse: 4 s auf die
angegebenen Potentiale; obere Reihe: Membranstrom; untere Reihe:
Kraftregistrierung; Nifedipin: $2\text{ }\mu\text{M}$; UV: 60 s Belichtung.

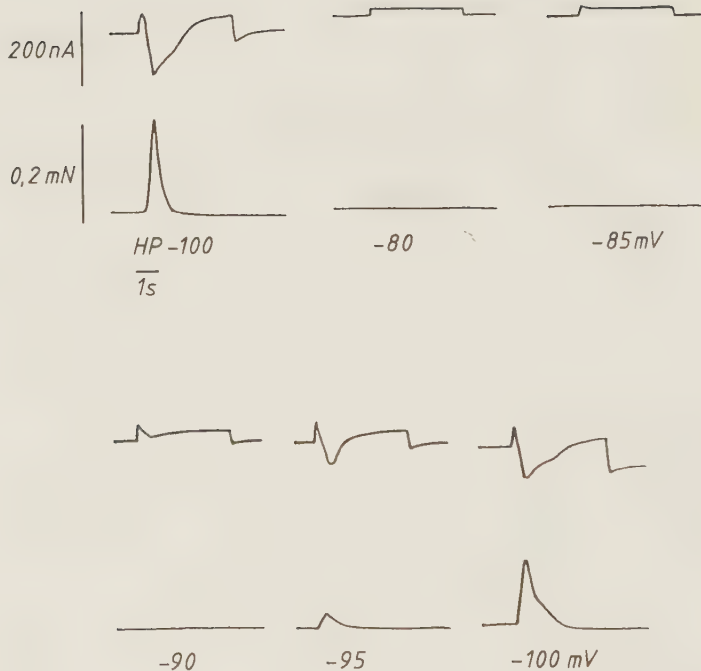


Abb. 22 Inaktivierungsverhalten von Strom und Kraft in Li^+ -Lactatlösung
 Badlösung: Lsg.I; $T=10^\circ\text{C}$; HP wie angegeben; Pulse: 4 s auf
 -50 mV; obere Spur: Membranstrom; untere Spur: Kraftregistrierung.

antwort bei einem HP von -90 mV mag darauf zurückzuführen sein, daß der Li^+ -Einstrom hier zu gering war, um eine meßbare Kontraktion zu induzieren. Im Gegensatz zu den von POTREAU und RAYMOND (1982) veröffentlichten Versuchsergebnissen konnte in den hier dargestellten Experimenten kein Unterschied zwischen Na^+ - und Li^+ -Einströmen hinsichtlich ihrer Wirkungen auf die Kraftentwicklung festgestellt werden.

4. DISKUSSION

4.1 Die Wirkung von Nifedipin auf den Potentialsensor der elektro-mechanischen Kopplung

Wie in den Kap. 3.3 und 3.5 gezeigt wurde, kam es unter der Einwirkung von Nifedipin zu Änderungen im Kontraktionsverhalten der Muskelfasern, die sich nicht auf eine Blockierung der Ca^{2+} -Kanäle zurückführen ließen. Hierbei wurden sowohl hemmende als auch fördernde Einflüsse auf die Kraftentwicklung beobachtet.

Die positive Wirkung des Ca^{2+} -Antagonisten äußerte sich in einer Verschiebung des Schwellenpotentials zur Kontraktionsauslösung in hyperpolarisierender Richtung. Eine geringe Verschiebung der Reizzeit-Spannungskurve nach Zugabe von Nifedipin wurde bereits von McCLESKEY (1985) beobachtet, der allerdings etwa 100-fach höhere Konzentrationen verwendete. In Gegenwart von 1-2 μM Nifedipin wurden in den eigenen Experimenten Rheobasewerte von -70 bis -75 mV registriert. Unter "normalen" Bedingungen lag die Rheobase zwischen -45 und -55 mV. Ein vergleichbares Phänomen trat in Versuchen auf, die bei weniger negativen Haltepotentialen (-70 mV) durchgeführt wurden. Dabei konnten unter Nifedipineinfluß durch kurze, aufeinanderfolgende Depolarisationen Dauerkontraktionen induziert werden, die nach Hyperpolarisation der Fasern oder nach Photoinaktivierung des Ca^{2+} -Antagonisten wieder in normale Einzelzuckungen übergingen. Die Blockierung der Ca^{2+} -Kanäle ist in diesem Zusammenhang eher ein Nebeneffekt, der als Ursache für die beobachtete Schwellenverschiebung ausgeschlossen werden kann. Die Pulse, die bei den Untersuchungen zur Wirkung von Nifedipin auf die Reizzeit-Spannungskurve appliziert wurden, waren hinsichtlich

ihrer Dauer und Amplitude in keinem Fall ausreichend, um einen Ca^{2+} -Einstrom durch die L-Typ Kanäle hervorzurufen. Dies läßt sich aus der sehr langsamen Kinetik und aus der relativ positiven Aktivierungsschwelle des Ca^{2+} -Stroms ableiten. Lediglich in den Experimenten, in denen Nifedipin eine Verzögerung der Relaxation nach Abschalten des Pulses bewirkte, kann das Auftreten eines Ca^{2+} -Einstroms unter Kontrollbedingungen (d.h. vor Zugabe von Nifedipin bzw. nach Belichtung) nicht völlig ausgeschlossen werden. Die Muskelfasern wurden dabei jeweils für 200 ms auf 0 mV depolarisiert. Allerdings wurde in den Stromspuren kein Anzeichen für einen Ca^{2+} -Einstrom festgestellt. Die Beobachtung, daß durch Hyperpolarisation die Nifedipin-induzierten Dauerkontraktionen wieder aufgehoben werden konnten, während die Blockierung der Ca^{2+} -Kanäle auch bei -150 mV (HP) erhalten blieb, spricht dafür, daß Nifedipin neben dem Ca^{2+} -Kanal noch einen anderen Wirkort besitzt.

Als Rezeptor des Nifedipins wird hier der von SCHNEIDER und CHANDLER (1973) postulierte Potentialsensor der elektro-mechanischen Kopplung vorgeschlagen. Wie schon in der Einleitung erläutert wurde, gilt der Potentialsensor in der T-tubulären Membran als Ursprungsort für die meßbaren intramembranaln Ladungsbewegungen (charge movements), die bei Depolarisation der Muskelfaser auftreten und mit der Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR korreliert sind. Aus den dargestellten Experimenten ist zu folgern, daß Nifedipin im Schwellenbereich der Kontraktion zu einer Sensibilisierung des Potentialsensors führt. In Gegenwart des Ca^{2+} -Antagonisten müßten demnach die intramembranaln Ladungsbewegungen schon bei negativeren Membranpotentialen auftreten. Eine solche Verschiebung in der Potentialabhängigkeit der Ladungsbewegungen wurde bisher nicht beschrieben. Bislang wurde in entsprechenden Experimenten mit der "cut fibre"-Methode nur die hemmende Wirkung von Nifedipin auf den Prozeß der elektro-

mechanischen Kopplung näher untersucht. Der Umstand, daß die von Nifedipin bewirkte Schwellenverschiebung erst nach mehrmaliger Aktivierung der Muskelfaser zustande kam, deutet auf eine potentialabhängige Bindung des Ca^{2+} -Antagonisten hin. Nach der "modulated receptor"-Theorie von HILLE (1977) läßt sich die Potentialabhängigkeit einer Wirkstoff-Rezeptor-Interaktion durch Konformationsänderungen der Bindungsstelle erklären. Man nimmt an, daß die verschiedenen Konformationen den verschiedenen Zustandsformen des Rezeptors entsprechen und damit letztlich vom Membranpotential abhängen. So konnte für die Wirkung von Lokalanästhetika auf den Na^{+} -Kanal gezeigt werden, daß die Konformation der Bindungsstelle (d.h. ihre Affinität zum Wirkstoff) mit den unterschiedlichen Kanalzuständen (ruhend, aktiviert, inaktiviert) gekoppelt ist. Dabei besitzen einige Substanzen die höchste Bindungsaffinität für den aktivierten (offenen) Kanal, während andere Stoffe bevorzugt an den inaktivierten Kanal binden. Für den Potentialsensor der elektro-mechanischen Kopplung lassen sich in gleicher Weise verschiedene Zustandsformen mit ihren Übergängen definieren:



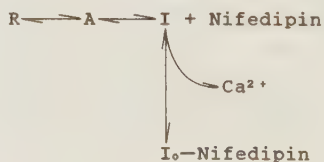
R bedeutet hierbei die Muskelfaser im Ruhezustand. A stellt den aktivierten Zustand dar, der durch Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR gekennzeichnet ist. Der Schritt von R nach A ist potentialabhängig und wird durch überschwellige Depolarisation der Muskelfaser eingeleitet. Bei längerer Depolarisation geht das System in einen inaktivierten Zustand (I) über. In diesem Refraktärstadium kann keine erneute Kontraktionsauslösung erfolgen. Erst eine Repolarisation der Muskelfaser führt zur Wiederherstellung des Ausgangszustands (R). Diese Rückführung kann theoretisch entweder direkt von I nach R erfolgen (im Modell nicht eingezeichnet), oder aber als Rückreaktion über den Zustand A. Im letzten Fall muß ange-

nommen werden, daß die Reaktion von A nach R mit relativ hoher Geschwindigkeit abläuft, da eine Kontraktionsaktivierung bei Repolarisation nicht beobachtet wird. Anhand dieses einfachen Modells läßt sich die fördernde Wirkung von Nifedipin durch eine Änderung in der Potentialabhängigkeit des Übergangs von R nach A beschreiben. In Analogie zu den von LEE und TSIEN (1983) vorgeschlagenen Wirkungsmechanismen der Ca^{2+} -Modulatoren am Ca^{2+} -Kanal (s. Einleitung) könnte man den experimentellen Befund formal mit einem zweiten Schaltverhalten (gating mode) erklären. Hierbei wäre das Modell des Potentialsensors um drei weitere Zustände (R^* , A^* , I^*) zu ergänzen. Dieses zweite, durch Nifedipin hervorgerufene Schaltverhalten unterscheidet sich vom ersteren durch einen geänderten Übergang vom ruhenden in den aktivierten Zustand (entsprechend einer Änderung im Schwellenpotential zur Kontraktionsauslösung). Um der Potentialabhängigkeit der Wirkung Rechnung zu tragen, wird davon ausgegangen, daß Nifedipin bevorzugt an den aktivierten Zustand (A) des Potentialsensors bindet.

Ein hemmender Einfluß von Nifedipin auf die Kraftentwicklung trat in Ca^{2+} -haltiger TEA-Lösung ($[\text{Ca}^{2+}] \approx 4 \text{ mM}$) nicht auf. Im Gegensatz zu einigen anderen Ca^{2+} -Antagonisten aus der Gruppe der Phenylalkylamine (D600, D888) und Benzothiazepine (Diltiazem) konnte unter vergleichbaren Bedingungen mit Nifedipin keine Paralyse ausgelöst werden (BÖHLE, GOTTSCHALK, NEUHAUS & LÜTTGAU, 1987; BÖHLE, ERDMANN, NEUHAUS & LÜTTGAU, in Vorbereitung). Erst die Verwendung Ca^{2+} -freier Badlösungen mit Mg^{2+} als Ersatz ließ eine inhibierende Wirkung des Ca^{2+} -Antagonisten in Form einer Verkürzung der Kontraktionen sichtbar werden. Aus weiteren Untersuchungen ging hervor, daß Nifedipin die Potentialabhängigkeit der Kraftinaktivierung beeinflusst.

Eine Abhängigkeit der Wirkung von Ca^{2+} -Antagonisten von der

extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, wie sie sich hier am Beispiel von Nifedipin darstellt, wurde bereits von FLECKENSTEIN (1983) für den Ca^{2+} -Kanal beobachtet. Anfangs wurde vermutet, daß beide (Ca-Ionen und Ca^{2+} -Antagonisten) an derselben Bindungsstelle am Ca^{2+} -Kanal kompetitiv angreifen (FLECKENSTEIN, 1977; KOHLHARDT, BAUER, KRAUSE & FLECKENSTEIN, 1972). Neuere Untersuchungen weisen jedoch auf verschiedene Bindungsstellen hin (LEE & TSIEN, 1983). Von GLOSSMANN, FERRY, GOLL, STRIESSNIG und ZERNIG (1985) wurde hierfür ein Modell entwickelt, das den drei Ca^{2+} -Antagonistenklassen (Phenylalkylamine, Benzothiazepine und Dihydropyridine) verschiedene Bindungsstellen am Ca^{2+} -Kanal zuordnet, die sowohl untereinander als auch mit der Kationenbindungsstelle in allosterischer Wechselwirkung stehen. Es gibt experimentelle Hinweise dafür, daß der Potentialsensor der elektro-mechanischen Kopplung ebenso wie der Ca^{2+} -Kanal über (mindestens) eine Bindungsstelle für Kationen verfügt. BRUM, FITTS, PIZARRO und RIOS (1987) entdeckten, daß in extrazellulären Lösungen, die TEA^+ als einziges Kation enthielten, die Kontraktilität von Skelettmuskelfasern verlor. Sie stellten die Hypothese auf, daß für die Aufrechterhaltung der Kontraktilität die Besetzung einer von der extrazellulären Seite zugänglichen Kationenbindungsstelle am Potentialsensor der elektro-mechanischen Kopplung unabdingbar ist. Die nachfolgend vorgeschlagene Interpretation der hemmenden Wirkung von Nifedipin soll anhand eines Zustandsmodells des Potentialsensors verdeutlicht werden:



Die drei Grundzustände R, A und I sowie die potentialab-

hängigen Übergänge zwischen ihnen wurden bereits im vorangegangenen Abschnitt erläutert. In Anlehnung an Experimente von RIOS und BRUM (1987), die zeigten, daß die hemmende Wirkung von Nifedipin auf den Ca^{2+} -Transienten und die intramembranaln Ladungsbewegungen nur bei relativ positiven Haltepotentialen auftreten, wird der Potentialsensor im inaktivierten Zustand (I) als Rezeptor für Nifedipin vorgeschlagen. Es wird weiterhin angenommen, daß die Anlagerung von Nifedipin an den Sensor die Abdissoziation von Ca^{2+} erleichtert und damit das System in einen zweiten inaktivierten Zustand (I_0) überführt. RIOS und BRUM (1987) führen sowohl die hemmende Wirkung von Nifedipin als auch die unter D600 und in Ca^{2+} -freien Lösungen zu beobachtende Paralyse letztlich auf die Ca^{2+} -Ablösung zurück.

Nach dem oben dargestellten Zustandsmodell ist mit Nifedipin eine Verschiebung der Kraftinaktivierungskurve in hyperpolarisierender Richtung zu erwarten. Das "charge movement"-Modell von SCHNEIDER & CHANDLER (1973) ordnet den Zuständen R und A verschiedene Aufenthaltsorte geladener Teilchen in der Membran des T-Systems zu. Der aktivierte Zustand (A) wird jedoch nur vorübergehend eingenommen. Bei langdauernden Depolarisationen, wie bei den konditionierenden Vorpulsen in den Inaktivierungsexperimenten, wird eine Verteilung auf die Zustände R und I erreicht. Die potentialabhängige Verteilung intramembranaler Ladungsträger läßt sich demzufolge formal mit einer Boltzmann-Funktion beschreiben:

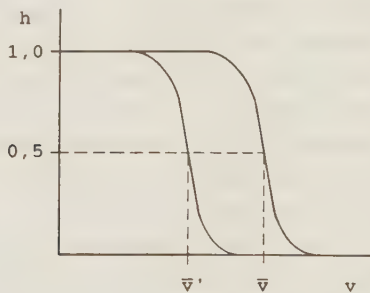
$$h = 1 / (1 + \exp[(v - \bar{v})/k])$$

Die Größe h entspricht hier der Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Zustand R. Übertragen auf die Inaktivierungsexperimente (vergl. Abb.15) ist dies gleichbedeutend mit der Fähigkeit zur Kraftentwicklung. Die Variable v symbolisiert das Membranpotential des konditionierenden Vorpulses, wobei

$\bar{v}$ das Potential angibt, bei dem eine halbmaximale Inaktivierung eintritt (halbmaximale Kraftamplitude). Die Größe k bestimmt die Steilheit der Kurve. Die Überführung des Systems aus dem inaktivierten Zustand I in einen zweiten inaktivierten Zustand I_0 durch Anlagerung von Nifedipin verursacht nach dem Modell eine Verschiebung der Potentialabhängigkeit der Ladungsverteilung (vergl. BEAN, 1984). Für das Potential der halbmaximalen Inaktivierung mit Nifedipin ($\bar{v}'$) gilt:

$$\bar{v}' = \bar{v} - k \cdot \ln(1 + [\text{Nifedipin}]/K_D)$$

K_D entspricht der Dissoziationskonstante des Nifedipin-Rezeptorkomplexes. Das nachfolgende Schema zeigt die zu erwartende Änderung der Parameter nach Zugabe von Nifedipin.



Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse aus den Inaktivierungsexperimenten können mit gewissen Einschränkungen zur Unterstützung dieser Modellvorstellung herangezogen werden. Eine genaue quantitative Beschreibung der Nifedipin-Wirkung läßt sich mit der Formel jedoch nicht erreichen, da in ihr der Einfluß des extrazellulären Calciums nicht berücksichtigt wird. Zudem läßt sich aus den im Experiment gewonnenen Daten wegen den Streuungen zwischen verschiedenen Muskelfasern kein konkreter Zahlenwert für eine Verschiebung der Inaktivierungskurve angeben.

In Ergänzung zu den Untersuchungen von BRUM und Mitarbeitern (1987) zur Beteiligung einer Ca^{2+} -Bindungsstelle am Prozeß der elektro-mechanischen Kopplung wurde von PIZARRO, FITTS und RIOS (1988) gezeigt, daß Ca^{2+} in seiner stabilisierenden Funktion durch andere Metallionen der Gruppen IA und IIA des Periodensystems ersetzt werden kann. Dabei erwiesen sich divalente Kationen besser geeignet als die monovalenten, wobei die Sequenz in etwa der für die Bindung im Ca^{2+} -Kanal entsprach. Diese Veröffentlichung gab den Anstoß zu einer Versuchsreihe, in der die Wirkung von Nifedipin in einer Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien Lösung (Lsg.D) getestet wurde. Die Lösung enthielt als einzige Kationensorte Na^+ in größerer Konzentration. In Kontraktorexperimenten wurde nach Zugabe von Nifedipin neben der schon zuvor beobachteten Verkürzung der Kraftantwort auch eine deutliche Abnahme der Kontrakturnhöhe festgestellt. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß der Entzug aller divalenten Kationen aus der Badlösung aufgrund fehlender Abschirmungen von Oberflächenladungen bereits zu einer Verschiebung der Kraftinaktivierungskurve in hyperpolarisierender Richtung führt. Deshalb können bei positiveren Haltepotentialen schon geringe zusätzliche Verschiebungen dieser Kurve durch Nifedipin zu relativ großen Änderungen im Inaktivierungsgrad der Kraft führen. Ein möglicher Grund dafür, daß die hemmende Wirkung von Nifedipin in Lsg.D nicht stärker hervortrat, könnte darin bestehen, daß die Ca^{2+} -Verunreinigung dieser Lösung noch ausreichte, um stabilisierend auf den Potentialsensor der Kraft zu wirken. Eine weitere Ursache für die zumeist quantitativen Unterschiede zwischen den eigenen Versuchsergebnissen und denen der oben aufgeführten Autorengruppen ist in den grundsätzlich verschiedenen Versuchsbedingungen zu sehen. Bei der "cut fibre"-Methode wird mit artifiziellen intrazellulären Lösungen gearbeitet, die im wesentlichen jedoch nur das ionale Milieu des Myoplasmas nachbilden. Eventuell besitzen die so behan-

delten Zellpräparate im Vergleich zu den intakten Muskelfasern eine erhöhte Sensibilität gegenüber Dihydropyridinen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß die gemessenen Ca^{2+} -Transienten kein direktes Maß für die Kraftamplitude darstellen. Hier treten insbesondere Sättigungseffekte auf, die dazu führen, daß die Kraftamplitude bereits bei Potentialen negativer als 0 mV ihr Maximum erreicht, wohingegen die Ca^{2+} -Freisetzung durch weitere Depolarisation über 0 mV hinaus noch verstärkt werden kann. Umstritten ist auch die Interpretation der "charge movement"-Messungen. Während RIOS und BRUM die gesamten "charge movements" dem Potentialsensor der elektro-mechanischen Kopplung zuschreiben, sehen andere Autoren (LAMB, 1986; LAMB & WALSH, 1987) den Nifedipin-sensitiven Teil der Ladungsbewegungen als Schaltstrom des Ca^{2+} -Kanals an.

Die ambivalente Wirkung von Nifedipin auf die elektro-mechanische Kopplung wirft die Frage auf, ob für die stimulierenden und inhibierenden Effekte getrennte Bindungsstellen am Potentialsensor existieren oder ob beide Wirkungen über die Bindung an denselben Rezeptor vermittelt werden. Für die Verhältnisse am Ca^{2+} -Kanal stellten REUTER und Mitarbeiter (1986) anhand von Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Dihydropyridinen fest, daß die agonistische und die antagonistische Wirkungskomponente über verschiedene Bindungsstellen erfolgt. Bei der in dieser Arbeit vorgelegten Interpretation der Wirkungen von Nifedipin auf die Kraftentwicklung wird gleichfalls von zwei verschiedenen Bindungsstellen ausgegangen: Für die hemmende Wirkung wurde in Übereinstimmung mit RIOS und BRUM (1987) eine Bindungsstelle mit hoher Affinität im inaktivierten Zustand des Sensors vorgeschlagen. Bei der stimulierenden Wirkung von Nifedipin ist eine Anbindung an den aktivierten Zustand wahrscheinlicher, da in den betreffenden Experimenten (Schwellenmessungen) bei den verwendeten Haltepotentialen und den

nur kurzen Depolarisationen noch keine Inaktivierung des Systems auftrat.

4.2 Die Rolle des Ca^{2+} -Einstroms bei der elektro-mechanischen Kopplung

Immer noch ungeklärt ist die Frage nach der Bedeutung des langsamen Ca^{2+} -Einstroms für die Kraftentwicklung am Skelettmuskel. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter Verwendung des Kanalblockers Nifedipin untersucht, ob die Hemmung des L-Typ Ca^{2+} -Kanals einen Einfluß auf das Kontraktionsverhalten hat. Wie die Versuche ergaben, konnte nach Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms auch bei längerer vollständiger Depolarisation keine meßbare Änderung in der Kraftantwort einer Muskelfaser erzielt werden. Ein interessantes Phänomen wurde jedoch bei submaximaler Aktivierung festgestellt: Hier führte die Blockierung des Ca^{2+} -Einstroms zu einer Verlängerung der Plateauphase der Kontraktionen. Umgekehrt konnte mit dem Ca^{2+} -Agonisten BAY K8644 parallel zum Auftreten des Ca^{2+} -Stroms eine beschleunigte Relaxation der Kraft während der Depolarisation erreicht werden. Vergleichbare Resultate erhielten LORKOVIC und RÜDEL (1983). Sie stellten unter dem Einfluß des anorganischen Ca^{2+} -Kanalblockers Cd^{2+} ebenfalls eine Verlängerung der Kontraktionen, d.h. eine Verzögerung der spontanen Inaktivierung, fest. Bei der Interpretation der Ergebnisse wird davon ausgegangen, daß der Ca^{2+} -Strom durch den L-Typ Kanal unter bestimmten Bedingungen (submaximale Aktivierung) die Inaktivierung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR beschleunigt oder auslöst, so daß die Hemmung des Einstroms zu einer Verzögerung dieses Prozesses führt. Für den Herzmuskel wurde von FABIATO (1983) ein ähnlicher Mechanismus gefordert, bei dem das aus dem SR freigesetzte Ca^{2+} über eine negative Rückkopplung die weitere Ausschüttung hemmt. FABIATO entdeckte in Experimenten an gehäuteten

Herzmuskelzellen, daß der durch eine optimale "trigger"- Ca^{2+} -Konzentration ausgelöste Ca^{2+} -Transient durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verkürzt werden konnte, wobei die Kontraktionsamplitude abnahm. Neben dieser " Ca^{2+} -induzierten Inaktivierung der Ca^{2+} -Freisetzung" ist am Skelettmuskel ein potentialabhängiger Inaktivierungsprozeß zu fordern. Dieser Mechanismus ist anscheinend bei vollständigen Depolarisationen dominierend, da, wie erwähnt, in solchen Fällen eine Blockierung der Ca^{2+} -Kanäle keinen Einfluß auf den Verlauf der Kraftrelaxation hatte. Für einen durch Ca^{2+} -Einstrom induzierten Inaktivierungsmechanismus wären intrazelluläre Ca^{2+} -Bindungsstellen mit niedriger Affinität zu fordern, die bei submaximaler Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und blockierten Ca^{2+} -Kanälen im T-System nicht abgesättigt werden. Geht man von der Hypothese aus, daß der Ca^{2+} -Kanal gleichzeitig als Potentialsensor der elektro-mechanischen Kopplung fungiert, so wäre als Alternative denkbar, daß der durch den Kanal fließende Ca^{2+} -Strom über elektrische Wechselwirkungen mit den intramembranaln Ladungsbewegungen den Schaltmechanismus für die Kopplung beeinflusst. Ein Zusammenhang zwischen dem Ca^{2+} -Einstrom und der Plateauphase der Kraftentwicklung wurde auch von ILDEFONSE und Mitarbeitern (1985) beschrieben. Sie stellten fest, daß sich die Dauer der zweiten Phase in der Kraftentwicklung parallel zum Zeitintervall zwischen dem Beginn der Depolarisation und dem Erreichen des Einstrommaximums verkürzt bzw. verlängert. Allerdings führen die genannten Autoren die Plateauphase der Kontraktur auf den Ca^{2+} -Einstrom zurück. Diese Betrachtungsweise setzt voraus, daß der Einstrom sich nahezu vom Beginn der Kontraktur bis zum Ende des Plateaus erstreckt. Dies war jedoch in den eigenen Experimenten nicht der Fall. Der Ca^{2+} -Einstrom aktivierte im Schwellenbereich (ca. -30 mV) mit einer relativ langen Latenzzeit. In der ersten Sekunde der Depolarisation war noch kein Unterschied zwischen dem Strom der Kontrolle und dem unter Einwirkung von Nifedipin zu er-

kennen. Die Kraftentwicklung ging in diesem Zeitraum aber bereits in die Plateauphase über. Beim Einsetzen des Ca^{2+} -Stromes waren keine Übergänge (Sprünge, etc.) im Krafttransienten zu beobachten. Zudem wäre nach Vorstellung der französischen Forschergruppe zu erwarten gewesen, daß die Blockierung der Kanäle zu einem Ausbleiben der zweiten Kraftkomponente führt. Es soll an dieser Stelle angemerkt werden, daß die hier diskutierten Änderungen im Kontraktionsverhalten unter Einfluß von Nifedipin nicht mit der in Kap.4.1 erörterten positiven Wirkung des Ca^{2+} -Antagonisten auf die Kontraktionsschwelle erklärt werden können. Darüberhinaus widersprechen die Ergebnisse der Experimente mit BAY K8644 und Cd^{2+} der Annahme, daß der Verlängerung der Plateauphase ein anderer Wirkungsmechanismus als die Blockierung des Ca^{2+} -Einstroms zugrunde liegt.

4.3 Strom-induzierte Kontraktionen in Na^{+} - und Li^{+} -Lactatlösungen

Die Experimente mit Ca^{2+} -freien Na^{+} -Lactatlösungen nehmen Bezug auf Untersuchungen, die von POTREAU und RAYMOND (1982) an Skelettmuskelfasern mit der "mannitol gap"-Technik durchgeführt wurden. Die Autoren stellten bei Depolarisation der Muskelfasern TTX-resistente Na^{+} -Einströme fest, die von Kontraktionen begleitet waren. Da dieses Phänomen in den Versuchen nur nach Zugabe von EGTA auftrat, vermuteten die Autoren, daß es sich nicht um einen Ionenstrom durch spezifische Kanäle handelt, sondern daß die Na^{+} -Leitfähigkeit durch die von EGTA bewirkte Destabilisierung der Membran hervorgerufen wird. In den Experimenten zu dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß der Na^{+} -Einstrom durch die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle erfolgt. Die Zugabe von mikromolaren Konzentrationen von Nifedipin führte zu einer Blockierung des Einstroms. Wie in der Einleitung dargelegt wurde, verliert der L-Typ Ca^{2+} -

Kanal seine hohe Selektivität in Abwesenheit von Ca^{2+} in der extrazellulären Lösung und läßt auch monovalente Kationen permeieren. Die Potentialschwelle zur Auslösung der Ströme lag bei etwa -70 mV. Dieser Wert erscheint sehr negativ im Vergleich zur Schwelle für den Ca^{2+} -Einstrom, die bei etwa -40 mV lag. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die fehlende Abschirmung negativer Oberflächenladungen in den Lactatlösungen wenigstens zum Teil diese Verschiebung in Richtung negativer Membranpotentiale erklärt. Unter den gegebenen Bedingungen traten sehr kurze, nadelförmige Kontraktionen auf, deren Potentialschwelle mit der des Na^+ -Stroms identisch war. Als weitere Gemeinsamkeiten von Strom und Kraft sind die Latenzzeiten und die in bestimmten Potentialbereichen gefundene Korrelation der Amplituden von Strom und Kontraktion zu nennen. Zudem konnten durch Nifedipin der Na^+ -Einstrom und die Kraftentwicklung in gleicher Weise beeinflusst werden. POTREAU und RAYMOND (1982) erhielten bei der Auftragung der Kontraktionsamplituden gegen das Membranpotential einen glockenförmigen Kurvenverlauf. Sie interpretierten dieses Verhalten mit den unterschiedlichen Beiträgen und der teilweisen Überlappung von strom- und potentialinduzierten Kontraktionen. Im Bereich sehr negativer Potentiale, in dem normalerweise noch keine Kraftentwicklung erfolgt, werden die Kontraktionen durch Einstrom von Na^+ ausgelöst. Bei stärkerer Depolarisation tritt zusätzlich die "normale" potentialabhängige Kraftantwort auf, d.h. es kommt zur Überlagerung beider Phänomene (Anstieg der Kraftamplitude). Gegen 0 mV nimmt der Einstrom und damit die von ihm hervorgerufene Kraftkomponente ab, woraus eine Reduzierung der Kraftamplitude resultiert. In den eigenen Experimenten konnten die Ergebnisse von POTREAU und RAYMOND mit Na^+ -Lactat bestätigt werden. Die Applikation von Nifedipin zur Hemmung des Na^+ -Einstroms führte jedoch zu einem vollständigen Verlust der Kontraktilität über den gesamten Potentialbereich. Dieser Umstand ist darauf zurückzuführen, daß Nifedipin in

Ca^{2+} -freien Lösungen auch hemmend auf den Potentialsensor der Kopplung wirkt (vergl. Kap.4.2). Bei Verwendung von mikromolaren Konzentrationen an Ca^{2+} wurde neben dem Einstrom nur die von ihm induzierte Kontraktion unterdrückt. Die Hypothese, daß der Na^+ -Einstrom Kontraktionen auslöst, wurde auch durch weitere Versuche, die eine Separation von Strom und Kontraktion zum Ziel hatten (z.B. Doppelpulseexperimente), gestützt. Bei Ersatz der Na-Ionen durch Li^+ konnte im Gegensatz zu Experimenten von POTREAU und RAYMOND kein Unterschied in der Wirkung auf die Kraftentwicklung festgestellt werden: Die einströmenden Li-Ionen lösten ebenso wie Na^+ Kontraktionen aus. Über einen konkreten Wirkungsmechanismus geben die Versuche keinen Aufschluß. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß das einströmende Na^+ bzw. Li^+ über eine Änderung des Ionenmilieus im Bereich der Triade fördernd auf einen Reaktionschritt der Kopplung zwischen dem Potentialsensor und den Ca^{2+} -Kanälen in der SR-Membran wirkt. Auch hier wäre als Alternative eine Interferenz des Einstroms mit den intramembranaln Ladungsbewegungen denkbar.

4.4 Schlußfolgerung und Ausblick

Der L-Typ Ca^{2+} -Kanal und der Potentialsensor der elektro-mechanischen Kopplung weisen hinsichtlich ihrer pharmakologischen Beeinflußbarkeit durch Dihydropyridine einige gemeinsame Merkmale auf. Beide Strukturen verfügen offenbar über Bindungsstellen für Dihydropyridine. Bei beiden lassen sich sowohl inhibitorische als auch stimulierende Wirkungen durch Ca^{2+} -Modulatoren auslösen. Weiterhin scheint auch der Potentialsensor wie der Ca^{2+} -Kanal eine Kationenbindungsstelle zu besitzen, die wiederum mit der Bindungsstelle für Dihydropyridine in allosterischer Wechselwirkung steht. Berücksichtigt man noch, daß beide Strukturen an den gleichen Stellen in der Membran einer Skelettmuskelfaser lokalisiert

sind (in der Membran des T-Systems) und daß die Struktur-
aufklärung des Dihydropyridin-Rezeptors sowohl Kanal- als
auch Potentialsensor-Eigenschaften zuläßt, so liegt die
Vermutung nahe, daß beide Strukturen identisch sind. Aller-
dings waren in den Experimenten der hier vorliegenden Arbeit
auch deutliche Unterschiede in der Sensitivität gegenüber
Nifedipin zu erkennen. Während der Ca^{2+} -Kanal in Gegenwart
von $1\text{ }\mu\text{M}$ Nifedipin vollständig blockiert werden konnte,
zeigte sich unter gleichen Bedingungen keine negative Wir-
kung auf die Kraftentwicklung. Im Gegensatz zur Situation am
Kanal war für die inhibierende Wirkung von Nifedipin auf den
Potentialsensor der elektro-mechanischen Kopplung die Redu-
zierung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erforderlich.
Diese Befunde schließen aber grundsätzlich nicht aus, daß
der von TANABE und Mitarbeitern (1987) sequenzierte DHP-Re-
zeptor sowohl den Ca^{2+} -Kanal als auch den Potentialsensor
der Kopplung repräsentiert. In diesem Fall wäre aufgrund der
dargelegten elektro-physiologischen Befunde davon auszuge-
hen, daß der DHP-Rezeptor über zwei unterschiedliche Poten-
tialsensorsegmente verfügt: Eines für das Schaltverhalten
des Ca^{2+} -Kanals und ein zweites für die ebenfalls potential-
abhängige Steuerung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR.

Ungeklärt bleibt die Frage, über welche Mechanismen die
Informationsübertragung vom Potentialsensor auf die Ca^{2+} -
"release"-Kanäle des SR erfolgt. Untersuchungen von VOLPE,
SALVIATI, Di VIRGILIO und POZZAN (1985) weisen auf eine mög-
liche Beteiligung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) bei
diesem Prozeß hin. Die Autoren konnten zeigen, daß IP_3 aus
isolierten SR-Vesikeln des Skelettmuskels Ca^{2+} freisetzt.
Für andere Zelltypen wurden bereits Modelle vorgeschlagen,
bei denen Membranrezeptoren über GTP-bindende Proteine (G-
Proteine) mit spezifischen Phosphodiesterasen gekoppelt
sind. Diese Enzyme setzen IP_3 aus Phosphatidylinositol-4,5-
bisphosphat ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) unter Abspaltung von Diacylgly-

cerin (DG) frei. Neuere Untersuchungen von Di VIRGILIO, SALVIATI, POZZAN und VOLPE (1986) bekräftigen die Hypothese, daß die elektro-mechanische Kopplung unter Beteiligung von G-Proteinen und IP_3 abläuft. Es ist jedoch noch umstritten, ob die Reaktionskette mit einem chemischen Überträgerstoff schnell genug ist, um für die elektro-mechanische Kopplung verantwortlich zu sein.

SCHNEIDER & CHANDLER (1973) gingen bei ihrem Modell der elektro-mechanischen Kopplung ursprünglich davon aus, daß der Potentialsensor in der T-tubulären Membran mit den Ca^{2+} -Kanälen in der SR-Membran direkt mechanisch gekoppelt ist. Diese Vorstellung hat in jüngster Zeit wieder an Bedeutung gewonnen. Hierzu haben biochemische Untersuchungen der Ca^{2+} -Freisetzungskanäle im SR beigetragen (LAI, ERICKSON, ROUSSEAU, LIU & MEISSNER, 1988). Mit Hilfe von [3H]-Ryanodin, einem Marker für die SR- Ca^{2+} -Kanäle, gelang die Isolierung eines 30 S Komplexes, der aus vier Polypeptiduntereinheiten von jeweils 400 kD zusammengesetzt ist. Das rekonstituierte und in Lipid-Membranen inkorporierte Protein besaß Ca^{2+} -Kanal-Eigenschaften. Im Elektronenmikroskop zeigte der Komplex eine typische "Füßchen"-Struktur. Diese Strukturen waren schon zuvor als überbrückende Elemente des 12 nm Spaltes zwischen T- und SR-Membran entdeckt worden (FRANZINI-ARMSTRONG, 1970). Einer weiteren Forschergruppe (KNUDSON, IMAGAWA, KAHL, GAVER, LEUNG, SHARP, JAY & CAMPBELL, 1988) gelang die Aufreinigung eines Komplexes, der sowohl Ryanodin-Bindungsstellen als auch DHP-Bindungsaktivität zeigte. Diese Befunde stützen die Hypothese, daß der Potentialsensor der elektro-mechanischen Kopplung über die "Füßchen" in Kontakt mit dem SR- Ca^{2+} -Kanal steht. Hierbei könnten die intramembranaln Ladungsbewegungen bei Depolarisation über eine Konformationsänderung der "Füßchen"-Struktur zu einer Öffnung der Kanäle im SR führen.

In der Abb.23 sind in einem Modell die an der Kopplung zwischen T-System und SR beteiligten Strukturen und die Angriffsstellen der Dihydropyridine dargestellt. Bei diesem Schema wurden beide oben vorgestellten Hypothesen der Kopplung aufgegriffen. Für die inhibierenden und stimulierenden Wirkungen der Dihydropyridine wurden verschiedene Bindungsstellen (-, +) eingezeichnet, wie sie von REUTER und Mitarbeitern (1986) für den Ca^{2+} -Kanal nachgewiesen wurden. Das Schema geht von der Annahme aus, daß der DHP-Rezeptor sowohl den Potentialsensor der Kopplung als auch den L-Typ Ca^{2+} -Kanal darstellt.

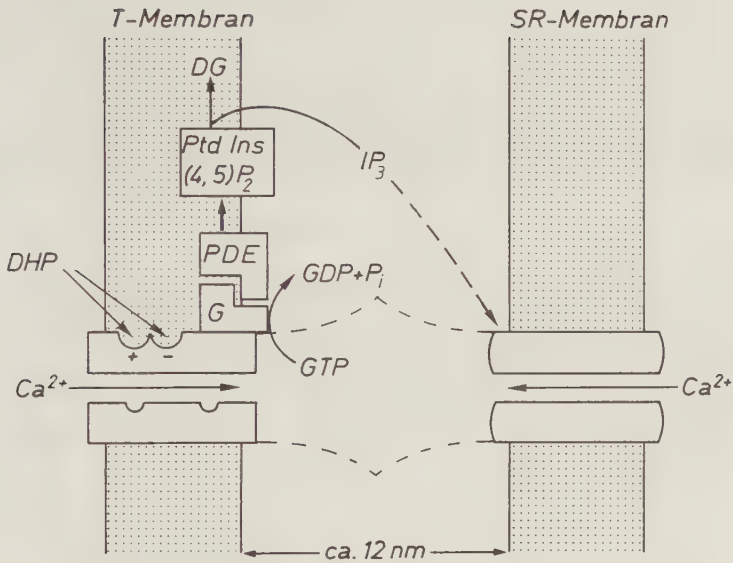


Abb. 23 Zwei Modelle zur elektro-mechanischen Kopplung zwischen T- und SR-Membran

1. Signalübertragung über Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) als Transmitter: Der Potentialsensor in der T-Membran aktiviert bei überschwelliger Depolarisation der Faser ein G-Protein, das über eine Phosphodiesterase (PDE) die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($\text{Ptd Ins}(4,5)\text{P}_2$) in Diacylglycerin (DG) und IP_3 auslöst. IP_3 diffundiert zur SR-Membran und bewirkt dort (direkt oder über Zwischenschritte) die Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen.
2. Direkte mechanische Kopplung zwischen Potentialsensor und Ca^{2+} -Kanälen im SR über die "Füßchen" (gestrichelt angedeutet). Der Potentialsensor der Kopplung ist in diesem Schema identisch mit dem L-Typ Ca^{2+} -Kanal. Eingezeichnet sind die Bindungsstellen für die inhibierende (-) und stimulierende (+) Wirkung der Dihydropyridine (DHP) sowie zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen im Kanal.

5. ZUSAMMENFASSUNG

(1) Die Wirkung von 1,4-Dihydropyridinen im Bereich des T-Systems auf den L-Typ Ca^{2+} -Kanal und auf den Potentialsensor der elektro-mechanischen Kopplung wurde an kurzen Zehenmuskelfasern des Frosches (Rana temporaria L.) untersucht. Die Experimente wurden unter "voltage clamp"-Bedingungen mit zwei intrazellulären flexiblen Elektroden durchgeführt.

(2) Die Zugabe von 400 nM des nicht-chiralen Ca^{2+} -Antagonisten Nifedipin erwies sich als ausreichend, um den langsamen Ca^{2+} -Einstrom zu blockieren. Die Blockade konnte durch mehrminütige Hyperpolarisation der Muskelfaser auf -150 mV nicht aufgehoben werden. Die Belichtung des Präparates mit einer Quecksilber-Hochdruckdampflampe führte zur Umwandlung des Nifedipins in ein unwirksames Nitroso-Derivat und damit zur Wiederherstellung des Ca^{2+} -Stroms.

(3) Der Ca^{2+} -Agonist BAY K8644 verursachte einen Anstieg der Ca^{2+} -Stromamplituden, eine Verschiebung des Schwellenpotentials zur Auslösung des Einstroms in Richtung negativer Membranpotentiale und eine Beschleunigung der Kinetik des Ca^{2+} -Einstroms.

(4) In den Versuchen zur Wirkung von Nifedipin auf die isometrische Kraftentwicklung wurde der Ca^{2+} -Antagonist in einer Konzentration eingesetzt, die am Ca^{2+} -Kanal zu einer vollständigen Blockierung führte (1-4 μM). Nifedipin zeigte hierbei sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte auf die Kraftentwicklung.

(5) Die Applikation von Nifedipin führte zu einer Verschiebung der Reizzeit-Spannungskurve der Kraftentwicklung um bis zu 25 mV zu negativeren Potentialen. Unter dem Einfluß des

Ca^{2+} -Antagonisten traten durch kurze depolarisierende Pulse von -90 auf -50 mV bereits registrierbare Kontraktionen auf, die nach Photoinaktivierung des Nifedipins mit gleichem Pulsprotokoll an derselben Faser nicht mehr zu beobachten waren.

(6) In Ca^{2+} -haltigen Versuchslösungen ($[\text{Ca}^{2+}] \approx 4 \text{ mM}$) konnte sowohl bei -90 als auch bei -70 mV HP unter Nifedipin keine Beeinträchtigung der Kraftentwicklung festgestellt werden. Im Gegensatz zu Gallopamil (D600) wurde mit Nifedipin unter vergleichbaren Bedingungen keine Paralyse erzielt.

(7) Nach Ersatz des extrazellulären Ca^{2+} durch Mg^{2+} bewirkte Nifedipin bei vollständiger Depolarisation eine Verkürzung der Kontrakturen sowie eine leichte Verschiebung der Kraft-Inaktivierungskurve in Richtung negativer Membranpotentiale. In einer Na^+ -haltigen Außenlösung ohne divalente Kationen wurde eine weitere Verstärkung der Kraftinaktivierung nach Zugabe von Nifedipin beobachtet, die allerdings z.T. auch auf Oberflächenladungs-Effekte zurückgeführt werden kann. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß eine ausreichende Menge an freiem Ca^{2+} in der extrazellulären Lösung die hemmende Wirkung von Nifedipin auf den Potentialsensor der elektromechanischen Kopplung verhindert, und daß Mg^+ und Na^+ die Ca -Ionen in dieser Eigenschaft nur partiell ersetzen können.

(8) In weiteren Experimenten wurde der Einfluß des Ca^+ -Einstroms durch den L-Typ Ca^{2+} -Kanal auf die Kraftentwicklung untersucht. Bei Depolarisation auf -30 mV ergab die Blockierung der Ca^{2+} -Kanäle langdauernde Kontrakturen. Der Ca^{2+} -Einstrom konnte nach Photoinaktivierung von Nifedipin wiederhergestellt werden. Kurz nach dem Maximum des Ca^{2+} -Einstroms setzte eine spontane langsame Relaxation der Kraftentwicklung ein. BAY K8644 bewirkte eine Förderung des Ca^{2+} -Einstroms und eine weitere Beschleunigung der spontanen Kraft-

relaxation. Diese Effekte konnten mit Ba^{2+} als Ladungsträger für den Einstrom durch den Ca^{2+} -Kanal nicht reproduziert werden.

(9) In Na^{+} - bzw. Li^{+} -Lactatlösungen mit 1mM EGTA (ohne divalente Kationen) traten bei Depolarisation der Muskelfasern Nifedipin-sensitive Na^{+} - bzw. Li^{+} -Ströme auf. Diese Einstrome waren stets von kurzen Kontraktionen begleitet, die nach Zugabe von Nifedipin nicht mehr ausgelöst werden konnten.

(10) Aufgrund der Befunde unter (8) und (9) wird gefolgert, daß die durch den Einstrom extrazellulärer Ionen hervorgerufene lokale Änderung des Ionenmilieus im Bereich der Triade modulierend auf einen einzelnen Schritt in der Kette von Reaktionen einwirkt, die letztlich zur Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem SR führt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ADRIAN, R.H. (1956): The effect of internal and external potassium concentration on the membrane potential of frog muscle. *J. Physiol.* 133, 631-658.
- ALMERS, W., FINK, R. & PALADE, P.T. (1981): Calcium depletion in frog muscle tubules: The decline of calcium current under maintained depolarization. *J. Physiol.* 312, 177-207.
- ALMERS, W. & McCLESKEY, E.W. (1984): Non selective conductance in calcium channels of frog muscle: calcium selectivity in a single-file pore. *J. Physiol.* 353, 585-608.
- ALMERS, W., McCLESKEY, E.W. & PALADE, P.T. (1985): Calcium channels in vertebrate skeletal muscle. In: Calcium in biological systems. Hrsg.: Rubin, R.P., Weiss, G.B. & Putney, J.W. Plenum Publishing Corporation, 321-330.
- ARMSTRONG, C.M., BEZANILLA, F.M. & HOROWICZ, P. (1972): Twitches in the presence of ethylene glycol bis (β -aminoethyl ether)-N,N'-tetraacetic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 267, 605-608.
- BEAN, B.P. (1984): Nitrendipine block of cardiac calcium channels: High-affinity binding to the inactivated state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6388-6392.
- BEAN, B.P. (1985): Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J. gen. Physiol.* 86, 1-30.

- BEATY, G.N. & STEFANI, E. (1976): Calcium dependent electrical activity in twitch muscle fibres of the frog. Proc. R. Soc. B 194, 141-150.
- BECHEM, M. & SCHRAMM, M. (1987): Calcium-Agonists. J. Molec. Cell. Cardiol. 19, 63-77.
- BELLEMANN, P., FERRY, D., LÜBBECKE, F. & GLOSSMANN, H. (1981): [³H]Nitrendipine, a potent calcium antagonist, binds with high affinity to cardiac membranes. Arzneim.-Forsch. 31, 2064-2067.
- BERWE, D. (1985): "Voltage clamp"-Untersuchungen an kurzen Muskelfasern des Frosches zum Einfluß von Ca-Ionen auf die Inaktivierung der mechanischen Kraft. Dissertation. Fakultät für Biologie, Ruhr-Universität Bochum.
- BIANCHI, C.P. & SHANES, A.M. (1959): Calcium influx in skeletal muscle at rest, during activity and potassium contracture. J. gen. Physiol. 42, 803-815.
- BÖHLE, T., GOTTSCHALK, G., NEUHAUS, R. & LÜTTGAU, H.Ch. (1987): The effects of Ca antagonists upon excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres. Pflügers Arch. 408, R79.
- BREHM, P. & ECKERT, R. (1978): Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium. Science 202, 1203-1206.
- BRUM, G., FITTS, R., PIZARRO, G. & RIOS, E. (1987): A Ca-Mg-Na site must be occupied for intramembrane charge movement and Ca release in frog skeletal muscle. Biophys. J. 51, 552a.

- CAILLÉ, J., ILDEFONSE, M. & ROUGIER, O. (1985): Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Prog. Biophys. molec. Biol.* 46, 185-239.
- CHAD, J.E. & ECKERT, R. (1986): An enzymatic mechanism for calcium current inactivation in dialysed helix neuro-nes. *J. Physiol.* 378, 31-51.
- COGNARD, C., LAZDUNSKI, M. & ROMEY, G. (1986): Different types of Ca^{2+} channels in mammalian skeletal muscle cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 517-521.
- CORONADO, R. & AFFOLTER, H. (1986): Characterization of dihydropyridine-sensitive calcium channels from purified skeletal muscle transverse tubules. In: *Ion channel reconstitution*. Hrsg.: Miller, C. Plenum Press, New York, 483-505.
- COTA, G., NICOLA SIRI, L. & STEFANI, E. (1984): Calcium channel inactivation in frog (*rana pipiens* and *rana moctezuma*) skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 354, 99-108.
- COTA, G. & STEFANI, E. (1986): A fast-activated inward calcium current in twitch muscle fibres of the frog (*rana montezuma*). *J. Physiol.* 370, 151-163.
- CURTIS, B.M. & CATTERALL, W.A. (1986): Reconstitution of the voltage-sensitive calcium channel purified from skeletal muscle transverse tubules. *Biochem.* 25, 3077-3083.

- Di VIRGILIO, F., SALVIATI, G., POZZAN, T. & VOLPE, P.
(1986): Is a guanine nucleotide-binding protein involved in excitation-contraction coupling in skeletal muscle? *EMBO J.* 5, 259-262.
- EBEL, S., SCHÜTZ, H. & HORNITSCHKE, A. (1978): Untersuchungen zur Analytik von Nifedipin unter besonderer Berücksichtigung der bei Lichtexposition entstehenden Umwandlungsprodukte. *Arzneim.-Forsch.* 28, 2188-2193.
- ECKER, A. (1896): Anatomie des Frosches: Lehre vom Skelett und vom Muskelsystem. 3. Auflage, (neubearb. v. Gaupp, E.), Vieweg Verlag, Braunschweig.
- EISENBERG, R.S., MCCARTHY, R.T. & MILTON, R.L. (1983): Paralysis of frog skeletal muscle fibres by the calcium antagonist D600. *J. Physiol.* 341, 495-505.
- EISENMAN, G. (1962): Cation-selective glass electrodes and their mode of operation. *Biophys. J.* 2, 259-323.
- FABIATO, A. (1983): Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 245, C1-C14.
- FELDMEYER, D. (1984): Morphologische und elektrophysiologische Untersuchungen an kurzen Muskelfasern des Frosches. Diplom-Arbeit. Fakultät für Biologie, Ruhr-Universität Bochum.
- FELDMEYER, D. (1987): Untersuchungen zur elektromechanischen Kopplung an Skelettmuskelfasern des Frosches. Dissertation. Fakultät für Biologie, Ruhr-Universität Bochum.

- FLAIM, S.F. & ZELIS, R. (1982): Calcium blockers. Mechanisms of action and clinical applications. Urban & Schwarzenberg, Baltimore-München.
- FLECKENSTEIN, A. (1972): Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 17, 149-166.
- FLECKENSTEIN, A. (1983): History of calcium antagonists. *Circ. Res.* 52, I3-I16.
- FLOCKERZI, V., OEKEN, H.J., HOFMANN, F., PELZER, D., CAVALIE, A. & TRAUTWEIN, W. (1986): Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature* 323, 66-68.
- FOSSET, M., JAIMOVICH, E., DELPONT, E. & LAZDUNSKI, M. (1983): [³H] Nitrendipine receptors in skeletal muscle. Properties and preferential localisation in transverse tubules. *J. Biol. Chem.* 258, 6086-6092.
- FOX, A.P., NOWYCKY, M.C. & TSIEN, R.W. (1987): Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J. Physiol.* 394, 173-200.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1970): Studies of the triad I. Structure of the junction in frog twitch fibres. *J. Cell. Biol.* 47, 488-499.
- GLOSSMANN, H., FERRY, D.R., GOLL, A., STRIESSNIG, J. & ZERNIG, G. (1985): Calcium channels and calcium channel drugs: recent biochemical and biophysical findings. *Arzneim.-Forsch.* 35, 2-20.

GODFRAIND, T., MILLER, R. & WIBO, M. (1986): Calcium Antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol. Rev.* 38, 321-416.

GOTTSCHALK, G. (1979): Untersuchungen zur elektromechanischen Kopplung an kurzen Muskelfasern. Diplomarbeit. Fakultät für Biologie, Ruhr-Universität Bochum.

GOTTSCHALK, G. (1984): "Voltage clamp"-Untersuchungen zu elektrischen und mechanischen Parametern kurzer Muskelfasern des Frosches. Dissertation. Fakultät für Biologie, Ruhr-Universität Bochum.

HERBETTE, L.G., CHESTER, D.W., & RHODES, D.G. (1986): Structural analysis of drug molecules in biological membranes. *Biophys. J.* 49, 91-94.

HESS, P. LANSMAN J.B. & TSIEN, R.W. (1984): Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature* 311, 538-544.

HILLE, B. (1977): Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J. gen. Physiol.* 69, 497-515.

HODGKIN, A.L. & HOROWICZ, P. (1959): The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. *J. Physiol.* 148, 127-160.

HUXLEY, A.F. (1974): Muscular contraction. *J. Physiol.* 243, 1-43.

- ILDEFONSE, M., JACQUEMOND, V., ROUGIER, O., RENAUD, J.F.,
FOSSET, M. & LAZDUNSKI, M. (1985): Excitation contrac-
tion coupling in skeletal muscle: Evidence for a role
of slow Ca^{2+} channels using Ca^{2+} channel activators and
inhibitors in the dihydropyridine series. *Biochem.*
Biophys. Res. Commun. 129, 904-909.
- ISENBERG, G. & KLÖCKNER, U. (1980): Glycocalyx is not re-
quired for slow inward calcium current in isolated
rat heart myocytes. *Nature* 284, 358-360.
- KASS, R.S. (1982): Nisoldipine: A new, more selective cal-
cium current blocker in cardiac Purkinje fibers. *J.*
Pharmacol. Exp. Ther. 223, 446-456.
- KNUDSON, C.M., IMAGAWA, T., KAHL, S.D., GAVER, M.G.,
LEUNG, A.T., SHARP, A.H., JAY, S.D. & CAMPBELL, K.P.
(1988): Evidence for physical association between
junctional sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor
and junctional transverse tubular dihydropyridine
receptor. *Biophys. J.* 53, 605a.
- KOHLHARDT, M., BAUER, B., KRAUSE, H. & FLECKENSTEIN, A.
(1972): Differentiation of the transmembrane Na and
Ca channel in mammalian cardiac fibres by the use of
specific inhibitors. *Pflügers Arch.* 355, 309-322.
- LAI, F.A., ERICKSON, H.P., ROUSSEAU, E., LIU, Q. & MEISSNER,
G. (1988): Purification and reconstitution of the cal-
cium release channel from skeletal muscle. *Nature* 331,
315-319.
- LAMB, G.D. (1986): Components of charge movement in rabbit
skeletal muscle: The effect of tetracaine and nifedi-
pine. *J. Physiol.* 376, 85-100.

- LAMB, G.D. & WALSH, T. (1987): Calcium currents, charge movement and dihydropyridine binding in fast- and slow-twitch muscles of rat and rabbit. *J. Physiol.* 393, 595-617.
- LEE, K.S. & TSIEN, R.W. (1983): Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature* 302, 790-794.
- LORKOVIC, H. & RÜDEL, R. (1983): Influence of divalent cations on potassium contracture duration in frog muscle fibres. *Pflügers Arch.* 398, 114-119.
- LÜTTGAU, H.Ch. & GLITSCH, H. (1976): Membrane physiology of nerve and muscle fibres. *Fortschr. Zool.* 24, 1-132.
- LÜTTGAU, H.Ch., GOTTSCHALK, G. & BERWE, D. (1987): The effect of calcium and Ca antagonists upon excitation-contraction coupling. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 717-723.
- LÜTTGAU, H.Ch. & SPIECKER, W. (1979): The effects of calcium deprivation upon mechanical and electrophysiological parameters in skeletal muscle fibres of the frog. *J. Physiol.* 296, 411-429.
- LÜTTGAU, H.Ch. & STEPHENSON, D.G. (1986): Ion movement in relation to the activation of contraction. In: *Physiology of membrane disorders* (Hrsg.: Andreoli, T.E., Hoffmann, J.F. & Fanestil, D.D. & Schultz, S.G.), Plenum Publishing Corporation, New York, 449-468.
- McCLESKEY, E.W. (1985): Calcium channels and intracellular calcium release are pharmacologically different in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 361, 231-249.

- McDONALD, T.F. & TRAUTWEIN, W. (1978): Membrane currents in cat myocardium - separation of inward and outward components. *J. Physiol.* 274, 193-216.
- NEUHAUS, R. (1986): The effect of nifedipine on slow Ca^{2+} inward current and force development in isolated skeletal muscle fibres of the frog. *J. Physiol.* 382, 122P.
- NICOLA SIRI, L., SANCHEZ, J.A. & STEFANI, E. (1980): Effect of glycerol treatment on the calcium current of frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 305, 87-96.
- NILIUS, B., HESS, P., LANSMAN, J.B. & TSIEN, R.W. (1985): A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 316, 443-446.
- PIZARRO, G., FITTS, R. & RIOS, E. (1988): Selectivity of a cation-binding membrane site essential for ec coupling in skeletal muscle. *Biophys. J.* 53, 645a.
- POTREAU, D. & RAYMOND, G. (1982): Existence of a sodium-induced calcium release mechanism on frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 333, 463-480.
- POWELL, J.A. & FAMBROUGH, D.M. (1973): Electrical properties of normal and dysgenic mouse skeletal muscle in culture. *J. cell. Physiol.* 82, 21-38.
- REUTER, H., PORZIG, H., KOKUBUN, S. & PROD'HOM, B. (1986): Voltage dependent binding and action of 1,4-dihydropyridine enantiomers in intact cardiac cells. In: *Proteins in excitable membranes*. Hrsg.: Hille, B., Fambrough, D.M. New York, 189-199.

- RIOS, E. & BRUM, G. (1987): Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* 325, 717-720.
- SANCHEZ, J.A. & STEFANI, E. (1978): Inward calcium current in twitch muscle fibres of the frog. *J. Physiol.* 283, 197-209.
- SARMIENTO, J.G., JANIS, R.A., KATZ, A.M. & TRIGGLE, D.J. (1984): Comparison of the high affinity binding of calcium channel blocking drugs to vascular smooth muscle and cardiac sarcolemmal membranes. *Biochem. Pharmacol.* 33, 3119-3123.
- SCHNEIDER, M.F. & CHANDLER, W.K. (1973): Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: A possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* 242, 244-246.
- SCHWARTZ, L.M., McCLESKEY, E.W. & ALMERS, W. (1985): Dihydropyridine receptors in muscle are voltage-dependent but most are not functional calcium channels. *Nature* 314, 747-751.
- SPIECKER, W. (1977): Untersuchungen über die Rolle von Calciumionen in der elektromechanischen Kopplung von Skelettmuskelfasern. Diplomarbeit. Fakultät für Biologie, Ruhr-Universität Bochum.
- STANFIELD, P.R. (1977): A calcium dependent inward current in frog skeletal muscle fibres. *Pflügers Arch.* 368, 267-270.

- TANABE, T., TAKESHIMA, H., MIKAMI, A., FLOCKERZI, V., TAKAHASHI, H., KANGAWA, K., KOJIMA, M., MATSUO, H., HIROSE, T. & NUMA, S. (1987): Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328, 313-318.
- TILLOTSON, D. (1979): Inactivation of Ca conductance dependent on entry of Ca ions in molluscan neurones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1497-1500.
- VOLPE, P., SALVIATI, G., Di VIRGILIO, F. & POZZAN, T. (1985): Inositol-1,4,5-trisphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature* 316, 347-349.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. H.Ch. Lüttgau für seine wissenschaftliche Betreuung durch zahlreiche Diskussionen und Anregungen. Für das gute Arbeitsklima, und für die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit danke ich allen meinen Kolleginnen und Kollegen, vor allem Herrn Dr. D. Feldmeyer und Herrn Dr. W. Melzer.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Professor Dr. F. Hoffmeister und Herrn Dr. B. Garthoff von der BAYER AG, die mir freundlicherweise die Substanzen Nifedipin und BAY K8644 zur Verfügung stellten.

Lebenslauf

geboren am	20. Juni 1958
Geburtsort	Gevensberg/Westfalen
Schulbesuch	1965-1968 Volksschule in Gevelsberg
	1968-1978 Gymnasium in Gevelsberg
	1978 Abitur
Wehrdienst	1978-1979
Studium und Ausbildung	1979-1985 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
	1985 Diplom in Biologie
	seit 1985 Dissertation am Lehrstuhl für Zellphysiologie der Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität Bochum

D. GRÄBNER

Dissertations- u. Offsetdruckerei

Gotenstraße 3

8602 Altendorf bei Bamberg

Telefon 09545 / 8791

